



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“Análisis de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje, e identificación de la presencia de bacterias termófilas, a través de técnicas de biología molecular.”**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERO AGRONOMO**

**AUTOR:**

Diego Fernando Clavijo Rosales

C.I.: 0105102073

**DIRECTORA:** Blga. Denisse Fabiola Peña Tapia, MSc.

C.I.: 0102501889

CUENCA, ECUADOR

2018



## RESUMEN

El compostaje es un proceso aeróbico en el que comunidades microbianas degradan sustratos orgánicos con el fin de generar un producto para la agricultura. Estas comunidades han sido estudiadas mediante técnicas tradicionales de cultivo, las cuales proporcionan resultados limitados de composición y diversidad poblacional; mientras que las técnicas de análisis metagenómico permiten obtener mejores resultados de caracterización de comunidades microbianas. En el presente estudio se analizó el comportamiento de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje de dos plantas a gran escala, cada una con sustratos diferentes (Desperdicios municipales y estiércol de cerdo), se evaluó la relación de los parámetros físico-químicos con la riqueza y diversidad bacteriana. Asimismo, se aisló e identificó bacterias termófilas y se formó un bio-banco de cepas adecuadamente identificadas. La diversidad bacteriana se determinó mediante separación electroforética de los amplicones generados, de la región 16S del ADNr, en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE). La identificación de bacterias termófilas, se realizó mediante secuenciación y la técnica de PCR con polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) con enzimas tipo *A<sub>1</sub>u<sub>1</sub>*, comparando con patrones de restricción obtenidos del Serial Cloner y secuencias del NCBI. Los resultados mostraron que las dos plantas bajo estudio presentan un valor de diversidad similar; por otra parte el tipo de población microbiana dentro de un proceso de compostaje está definido principalmente por el sustrato. Así mismo el factor que más se correlaciona con la diversidad bacteriana es el pH. En total se obtuvo 45 aislados de la etapa termófila, principalmente pertenecientes al filo Firmicutes, y a los géneros *Bacillus*, *Ureibacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*.

## PALABRAS CLAVE

Bacterias termófilas, compost, diversidad bacteriana, DGGE, PCR-RFLP.



## ABSTRACT

Composting is an aerobic process in which microbial communities degrade organic substrates in order to generate a product for agriculture. These communities have been studied through traditional culturing techniques, which provide limited results of composition and population diversity; while the metagenomic analysis allow obtaining better results of characterization of microbial communities. In the present study, the behavior of bacterial diversity during the composting process of two large-scale plants, each with different substrates (municipal waste and pig sturgeon), were analyzed. And assessed the relationship of physical-chemical parameters with the richness and microbial diversity. In addition, we isolated and identified thermophilic bacteria and formed a bio-bank of these strains. Bacterial diversity was determined by electrophoretic separation of the amplicons generated, from the 16S region of the rDNA, in denaturing gradient denaturing polyacrylamide gels (DGGE). The identification of thermophilic bacteria was carried out by sequencing and PCR technique with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) with *A**lu*I enzymes, comparing with restriction patterns obtained from the Serial Cloner and NCBI sequences. The results showed that the two plants under study present a similar diversity value; On the other hand, the type of microbial population within a composting process is defined mainly by the substrate. Likewise, the factor that most correlates with bacterial diversity is pH. In total 45 isolates were obtained from the therm row stage, mainly belonging to the Firmicutes phylum, and to the genera *Bacillus*, *Ureibacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*.

## KEYWORDS

Thermophilic bacteria, compost, bacterial diversity, DGGE, PCR-RFLP.



## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INDICE DE CONTENIDOS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE ANEXOS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.....	11
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	12
DERECHOS DEL AUTOR.....	13
DEDICATORIA.....	15
AGRADECIMIENTOS.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Compostaje.....	20
3.1.1. Proceso de Compostaje.....	20
3.1.2. Factores biológicos del proceso de Compostaje.....	23
3.1.3. Diversidad bacteriana en la etapa termófila del proceso de Compostaje.....	25
3.2. Analisis de las comunidades microbianas.....	26
3.3. Usos e importancia biotecnológica de bacterias termófilas.....	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1. Area de Estudio.....	32
4.2. Area de Ejecución del Proyecto.....	33
4.3. Colecta, conservación transporte, almacenado de las muestras de compost.....	33
4.4. Procesamiento de las muestras bilógicas colectadas.....	33
4.4.1. Extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico metagenómico total.....	33
4.5. Amplificación de marcadores moleculares bacterianos mediante la reacción de PCR convencional.....	34
4.6. Separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturizante.....	35
4.7. Análisis de los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida.....	36
4.8. Análisis físico y químico de las muestras de compost.....	37



4.8.1. Análisis del contenido de humedad .....	37
4.8.2. Análisis de conductividad eléctrica y concentración de iones Hidrógeno	37
4.8.3. Análisis de Materia Orgánica.....	38
4.8.4. Calculo de Carbono orgánico del compost .....	38
4.8.5. Calculo de la relación Carbono y Nitrógeno .....	39
4.9. Analisis estadístico.....	39
4.10. Cultivo, aislamiento y purificación de bacterias termófilas de las muestras de compost .....	40
4.11. Extracción de ADN de las bacterias termófilas .....	41
4.12. Identificación de las bacterias termófilas .....	41
4.12.1. Amplificación de marcadores moleculares bacterianos mediante reacción de PCR convencional.....	41
4.12.2. Purificación del producto de PCR.....	42
4.12.3. Corte del producto de PCR con enzima de Restricción <i>A/ul</i> .....	43
4.12.4. Interpretación de los perfiles de restricción .....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Extracción del ADN metagenómico .....	45
5.2. Amplificación del ADn bacteriano de la region del ARNr 16s .....	46
5.3. Separación de los productos amplificados mediante DGGE .....	47
5.4. Análisis de la riqueza, estructura y diversidad bacteriana .....	48
5.5. Características físicas y químicas del proceso de compostaje .....	52
5.6. Correlación entre los índices de riqueza y de diversidad de las comunidades microbianas frente a las características físico-químicas del compost.....	59
5.7. Cultivo de bacterias termófilas .....	60
5.8. Extracción de ADN de bacterias termófilas .....	61
5.9. Amplificación del ADN bacteriano para la región 16s .....	62
5.10. Identificación de las bacterias termófilas .....	64
6. DISCUSIÓN .....	70
7. CONCLUSIONES .....	80
8. RECOMENDACIONES .....	82
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	83
10. ANEXOS .....	91



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Ejemplos de aplicaciones industriales de enzimas provenientes de microorganismos termófilos.....	31
<b>Tabla 2:</b> Datos generales de ubicación de las Plantas de Compostaje.....	32
<b>Tabla 3:</b> Reactivos y concentraciones usadas en la reacción de PCR convencional.....	34
<b>Tabla 4:</b> Reactivos y concentraciones usadas en la reacción de PCR convencional (2).....	41
<b>Tabla 5:</b> Valores del Índice de Diversidad e índice de Riqueza de las comunidades bacterianas de las muestras de compost para cada una de las plantas de compostaje Emac e Italiana, calculados a partir de los perfiles generados a través de la técnica de DGGE.....	49
<b>Tabla 6:</b> Prueba de <i>t de student</i> ( $p<0.05$ ) para las variables de diversidad y riqueza bacteriana del composta, con respecto al sustrato de cada una de las plantas estudiadas.....	50
<b>Tabla 7:</b> Propiedades Físico-químicas de las muestras de compost por Fases.....	53
<b>Tabla 8:</b> Características de la temperatura durante el compostaje.....	54
<b>Tabla 9:</b> Resultados de la prueba de <i>t de student</i> ( $p<0.05$ ) para los elementos químicos del compost, con respecto al tipo de sustrato usado en cada una de las plantas.....	58
<b>Tabla 10:</b> Identificación de los aislados obtenidos a partir del cultivo de las muestras de composta a 55° C de cada una de plantas de compostaje, a través de secuenciación tipo Sanger.....	68
<b>Tabla 11:</b> Estadísticos descriptivos de la variable física Temperatura interna (° C) de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	94
<b>Tabla 12:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable física Temperatura interna.....	94
<b>Tabla 13:</b> Estadísticos descriptivos de la variable física Humedad (%) de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	95
<b>Tabla 14:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable física Humedad.....	95
<b>Tabla 15:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química pH de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	96
<b>Tabla 16:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química pH. ....	96
<b>Tabla 17:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Conductividad eléctrica de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	97
<b>Tabla 18:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Conductividad eléctrica. ....	97
<b>Tabla 19:</b> Estadísticos descriptivos de la variable biológica Materia Orgánica de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	98
<b>Tabla 20:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable biológica Materia Orgánica.....	98
<b>Tabla 21:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Carbón orgánico de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	99
<b>Tabla 22:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Carbón orgánico.....	99



<b>Tabla 23:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Nitrógeno total de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	100
<b>Tabla 24:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Nitrógeno total.....	100
<b>Tabla 25:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Fosforo de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	101
<b>Tabla 26:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Fosforo.....	101
<b>Tabla 27:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Potasio de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	102
<b>Tabla 28:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Potasio.....	102
<b>Tabla 29:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Calcio de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	103
<b>Tabla 30:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Calcio.....	103
<b>Tabla 31:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Magnesio de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	104
<b>Tabla 32:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Magnesio.....	104
<b>Tabla 33:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química Azufre de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	105
<b>Tabla 34:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Azufre.....	105
<b>Tabla 35:</b> Estadísticos descriptivos de la variable química R. C/N de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	106
<b>Tabla 36:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química R. C/N.....	106
<b>Tabla 37:</b> Estadísticos descriptivos de la variable biológica Diversidad bacteriana de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	107
<b>Tabla 38:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable biológica Diversidad bacteriana.....	107
<b>Tabla 39:</b> Estadísticos descriptivos de la variable biológica Riqueza bacteriana de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.....	108
<b>Tabla 40:</b> Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable biológica Riqueza bacteriana.....	108
<b>Tabla 41:</b> Resultados del análisis estadístico de las características físico-químicas de las muestras de compost; test de Levene y prueba de <i>t</i> para muestras independientes, de las plantas estudiadas (A y B).....	109
<b>Tabla 42:</b> Resultados del análisis estadístico de la característica química R. C/N de las muestras de compost; test no paramétrico de U Mann-Withney ( $p < 0,05$ ), de las plantas estudiadas (A y B).....	109
<b>Tabla 43:</b> Test de correlación paramétrico <i>R</i> de Pearson para las variables físicas y químicas.....	111



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Factores que contribuyen a la formación del Compost. Fuente: Martínez (2013).....	22
<b>Figura 2:</b> Comunidades microbianas durante el proceso de compostaje: relación a la temperatura. Fuente: Insam & Bertoldi (2007).....	23
<b>Figura 3:</b> Rango de temperatura de microorganismos Psicrófilos, mesófilos y termófilos, y su tiempo de generación. Fuente: Insam & Bertoldi (2007).....	24
<b>Figura 4:</b> Pasos para el análisis de comunidades microbianas por el método de PCR-DGGE. Fuente: Gaona <i>et al.</i> (2012).....	28
<b>Figura 5:</b> Localización a nivel Provincial y cantonal de las Plantas de Compostaje en estudio; Fuente: SIN.....	32
<b>Figura 6:</b> Protocolo manual para purificación de producto de PCR.....	43
<b>Figura 7:</b> Electroforesis en gel de Agarosa (1% p/v) del producto de extracción de ADN metagenómico de las muestras de compost: 67-77 Planta A y 78-86 Planta B. Línea M, Generuler™ 1 Kpb plus DNA Ladder (Fermentas).....	45
<b>Figura 8:</b> Amplificación por TD-PCR del ARNr 16S con los cebadores F968GC-1401R sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas cercanas a 500 pb aproximadamente. Línea M, Generuler™ 100 pb plus DNA Ladder (Fermentas).....	46
<b>Figura 9:</b> Perfil de DGGE con rango desnaturalizante de 35% a 55% para el ARNr 16S en comunidades bacterianas de dos plantas productoras de compost, de diferente edad de compostaje: <b>(a)</b> Planta de compostaje de la EMAC, <b>(b)</b> Planta de compostaje de La Italiana, Línea M marcador correspondiente a la muestra 1067 de la planta de compost <b>A</b> .....	48
<b>Figura 10:</b> Dinámica de la riqueza y diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje de dos plantas <b>A</b> y <b>B</b> productoras; Índice de Shannon Weaver ( <b>H</b> ), Índice de Riqueza de especies( <b>S*</b> ).....	49
<b>Figura 11:</b> Análisis de agrupamiento jerárquico UPGMA a partir de los perfiles de DGGE de fragmentos amplificados para la región 16S ARNr de bacterias a partir de ADN metagenómico en muestras de compost a partir de la edad del compostaje en días: <b>(a)</b> Agrupamiento de muestras de la planta <b>A</b> , <b>(b)</b> Agrupamiento de muestras de la planta <b>B</b> y <b>(c)</b> Agrupamiento de muestras de las planta <b>A</b> con la planta <b>B</b> en conjunto.....	51
<b>Figura 12:</b> Resultados expresados en promedio de los análisis Físicos, Químicos y Biológicos de las dos plantas de compostaje bajo estudio. Índice de Shannon Weaver ( <b>H</b> ), Índice de Riqueza de especies ( <b>S*</b> ) .....	53
<b>Figura 13:</b> Dinámica de las temperaturas, ambiental e interna del compost a lo largo del proceso de compostaje <b>A</b> y <b>B</b> .....	54
<b>Figura 14:</b> Dinámica de las características físicas y químicas de las muestras de compost de la planta <b>A</b> y <b>B</b> ; pH, Conductividad eléctrica (Ce dSm <sup>-1</sup> ) y humedad (%).....	56
<b>Figura 15:</b> Características químicas de las muestras de compost de la planta <b>A</b> y <b>B</b> ; Materia Orgánica (M.O.%), Carbono orgánico (C. Org. %), Nitrógeno total (N total %) y relación Carbono-Nitrógeno (R. C/N).....	57
<b>Figura 16:</b> Comportamiento de los elementos químicos (P, K, Ca, Mg, S disponibles) durante el proceso de compostaje para cada una de las plantas <b>A</b> y <b>B</b> , a partir del análisis químico de sus muestras.....	58



<b>Figura 17:</b> Cultivo de bacterias termófilas a partir de diluciones de muestras de compost en medio LB (Luria-Bertani) y medio NA (Agar nutritivo) incubadas durante 24 horas: <b>(a)</b> cultivos provenientes de muestras de compost de la planta <b>A</b> , <b>(b)</b> cultivos provenientes de muestras de compost de la planta <b>B</b> .....	61
<b>Figura 18:</b> Extracción de ADN de prueba a partir de biomasa de bacterias termófilas. Línea M, Generuler™ 1 Kpb plus DNA Ladder (Fermentas).....	62
<b>Figura 19:</b> Amplificación por PCR normal del ARNr 16S con cebadores 27F y 1495R sometidas a electroforesis en gel de Agarosa al 1% p/v, bandas entre 1200 y 1500 pb aproximadamente: <b>(a)</b> aislados del 2 al 30, <b>(b)</b> aislados del 31 al 46. Línea M, Generuler™ 100 pb plus DNA Ladder (Fermentas).....	63
<b>Figura 20:</b> PCR-RFLP ( <i>AluI</i> ) perfiles de corte en gel de agarosa al 1.6%. Para PCR-RFLP se amplifico la región 16S ADNr con cebadores 27F/1495R. <b>(a)</b> Perfiles de corte para las cepas de la 2 a la 22, aislados provenientes de la planta <b>A</b> y perfiles de corte para las cepas 23 a la 29 provenientes de la planta <b>B</b> , <b>(b)</b> Perfiles de corte para las cepas de las 30 a la 46, aislados provenientes <b>B</b> . Línea M, Generuler™ 100 pb plus DNA Ladder (Fermentas).....	65
<b>Figura 21:</b> Análisis de agrupamiento jerárquico UPGMA de patrones de PCR-RFLP de fragmentos amplificados de la región 16s ARNr de bacterias a partir de ADN de microorganismos termófilos aislados de las dos Plantas de Compost; <b>(a)</b> Agrupamiento de los microorganismos de la planta <b>A</b> , <b>(b)</b> Agrupamiento de los microorganismos de la planta <b>B</b> y <b>(c)</b> Agrupamiento de los microorganismos de las plantas <b>A</b> y <b>B</b> en conjunto.....	67
<b>Figura 22:</b> Análisis de restricción obtenido con el software Serial Cloner de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (Z26928) incubado con enzima <i>AluI</i> , a partir de la secuencia obtenida del NCBI.....	67
<b>Figura 23:</b> Identificación de los aislados obtenidos a partir del cultivo de las muestras de compost a 55° C de cada una de plantas de compostaje, a través de secuenciación tipo Sanger y los patrones de restricción obtenidos en el análisis de PCR-RFLP.....	69
<b>Figura 24:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable física Temperatura interna.....	94
<b>Figura 25:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable física Humedad.....	95
<b>Figura 26:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química pH.....	96
<b>Figura 27:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Conductividad eléctrica.....	97
<b>Figura 28:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable Biológica Materia Orgánica.....	98
<b>Figura 29:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Carbón orgánico.....	99
<b>Figura 30:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Nitrógeno total.....	100
<b>Figura 31:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Fosforo.....	101
<b>Figura 32:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Potasio.....	102
<b>Figura 33:</b> Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Calcio.....	103



**Figura 34:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Magnesio.....104

**Figura 35:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Azufre.....105

**Figura 36:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química R. C/N.....106

**Figura 37:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable biológica Diversidad bacteriana.....107

**Figura 38:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable biológica Riqueza bacteriana.....108



## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Diagrama de Flujo del protocolo de Extracción de ADN total (metagenómico) para las muestras de compost usando el Kit Powersoil® DNA isolation kit (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU).....	91
<b>Anexo 2:</b> Diagrama de flujo para el protocolo de purificación de ADN total extraído de las muestras de compost, usando el kit PureLink™ Quick gel extraction (Invitrogen).....	92
<b>Anexo 3:</b> Valores de cuantificación del ADN total (metagenómico) después de extracción y re-purificación de las muestras de compost.....	92
<b>Anexo 4:</b> Cuantificación del Producto de PCR de la región 16S del ARNr del ADN total de las muestras de compost.....	93
<b>Anexo 5:</b> Análisis estadístico de las variables en estudio.....	93
<b>Anexo 6:</b> Test de correlación paramétrico <i>R de Pearson</i> para las variables físicas y químicas que presentan una distribución normal de sus datos con las variables Diversidad y riqueza bacteriana.....	110
<b>Anexo 7:</b> Test de correlación no paramétrico <i>Rho de Spearman</i> para la variable R. C/N con las variables Diversidad y riqueza bacteriana.....	111
<b>Anexo 8:</b> Características físico-químicas y biológicas de cada una de las muestras de compost de las dos plantas bajo estudio ( <b>A</b> y <b>B</b> ).....	112
<b>Anexo 9 :</b> Aislados de microorganismos termófilos incubados en medio LB y AN a 55° C durante 24 h, para cada una de las muestras de compost de las plantas estudiadas A y B. La muestra marcada se considera perdida ya que no se pudo obtener colonias a partir del criobanco por razones desconocidas.....	113



## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

- NCBI:** por sus siglas en Ingles *National Center for Biotechnology Information*.
- C:** Carbono
- N:** Nitrógeno
- pH:** Potencial de iones Hidrógeno
- R.C/N:** Relación Carbono y Nitrógeno
- Ejem:** Ejemplo
- O:** Oxígeno
- S:** Azufre
- PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- DGGE:** Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante
- RFLP:** Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción
- ms.n.m:** metros sobre el nivel del mar
- Ce:** Conductividad eléctrica
- M.O.:** Materia orgánica
- C org.:** Carbón orgánico
- Nt:** Nitrógeno total
- P:** Fosforo
- K:** Potasio
- Ca:** Calcio
- Mg:** Magnesio
- UTOs:** Unidades Taxonómicas Operacionales
- UPGMA:** por sus siglas en Ingles *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
- H:** Índice de diversidad de Shannon-Weaver
- S\*:** Riqueza específica
- NB:** por su siglas en Ingles *Nutrient Broth*
- LB:** Medio Luria-Bertani
- AN:** Agar Nutritivo
- SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio
- Tris:** tris (hidroximetil) aminometano
- TAE:** Tampon de Tris, acetato y EDTA
- M1:** fase mesófila uno
- T:** fase termófila
- M2:** fase mesófila dos
- E:** fase de enfriamiento
- M:** Media
- DE:** Desviación Estándar
- kpb:** kilopares de bases
- pb:** pares de bases
- dS m<sup>-1</sup>:** deciSiemens/metro



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo, Diego Fernando Clavijo Rosales, autor de la tesis "Análisis de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje, e identificación de la presencia de bacterias termófilas, a través de técnicas de biología molecular.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 07 Febrero del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Diego F. Clavijo R.', written over a horizontal line.

Diego Fernando Clavijo Rosales

C.I: 0105102073



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Yo Clavijo Rosales Diego Fernando en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la tesis “Análisis de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje, e identificación de la presencia de bacterias termófilas, a través de técnicas de biología molecular.”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 07 de Febrero de 2018

---

Diego Fernando Clavijo Rosales

CI: 0105102073



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cuenca, 20 de Marzo 2018

Lcda.

Estela Duran

Coordinadora

Centro de Documentación Regional "Juan Bautista Vázquez", Campus Yanuncay

Su despacho

Reciba un cordial saludo, a través del presente pongo en su conocimiento que soy Directora/Tutora del trabajo de titulación: **"Análisis de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje, e identificación de la presencia de bacterias termófilas, a través de técnicas de biología molecular."** realizado por el estudiante Diego Fernando Clavijo Rosales con número de cédula **0105102073** de la Carrera de **Ingeniería Agronómica**, documento que será publicado en una revista científica.

Para cumplir con el correspondiente proceso de publicación solicito a Ud. que en el Repositorio Institucional solo se visibilicen los metadatos de este documento y el archivo digital se mantenga en embargo hasta el **21 de Marzo de 2020**.

Por la favorable atención que se digne dar a la presente, le anticipo mi agradecimiento.

Atentamente,

Blga. Denisse Peña

CI.: 0102501889

diego\_855833@hotmail.com



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Hidalgo y Mónica. A mi papa por siempre apoyarme en mis estudios y enseñarme que en la vida hay que luchar por las cosas que más queremos. A mi mama por estar a mi lado en las buenas y en las malas y por demostrarme que el esfuerzo es todo lo que se necesita para triunfar.

A mis hermanos Santiago y Estefanía, por siempre estar a mi lado y acompañarme durante toda mi formación, y motivarme a continuar adelante con mis estudios y que todo valdrá la pena al final.

A mi familia entera, mis abuelos, tíos y primos por siempre demostrar interés en mi formación y apoyarme a cada momento.

Diego Clavijo



## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme fuerza para seguir adelante cada día de mi vida y en especial durante mi formación profesional.

A mis padres, por su paciencia y apoyo fundamental durante este proceso de formación.

Mis Agradecimientos a la Universidad de Cuenca por abrirme las puertas y ayudarme con mi formación profesional.

A mi directora la Bióloga Denisse Peña, por dedicar su tiempo y contribuir con sus conocimientos durante este proyecto.

Al Dr. Antonio Vallecillo por brindarme su apoyo, tiempo y conocimientos durante el desarrollo del proyecto, que fueron de suma importancia para la consecución del mismo.

Al Dr. Eduardo Chica por brindarme todo el tiempo y la confianza que me brindo a lo largo del proyecto.

Al Dr. Andres Yarzabal por brindarme su apoyo a lo largo del proyecto.

A los diferentes docentes de la Universidad de Cuenca por brindarnos su conocimiento y paciencia a lo largo de estos años de formación.

A la Empresa EMAC y la Bióloga Ligia Carrión por permitirme la recolección de muestras de la Planta de Compostaje.

A la Empresa La Italiana y al Ingeniero Christian Gonzales por brindarme su apoyo con la toma de muestras de la planta de compostaje y su continuo interés en el proyecto.

Diego Clavijo



## 1. INTRODUCCIÓN

A medida que la producción de desechos municipales orgánicos y desechos animales ha ido en aumento, la materia orgánica de los suelos se ha ido perdiendo debido a la agricultura intensiva. En los últimos años el compostaje se ha considerado como una alternativa viable y ambientalmente amigable para el manejo de los desechos orgánicos, en comparación con los métodos comunes de eliminación de residuos en rellenos sanitarios, botaderos o incinerados; además el uso de esta práctica favorece al cuidado del medio ambiente, la salud y una producción agrícola sostenible y sustentable.

En la naturaleza los microorganismos se encuentran formando parte de comunidades complejas, en las cuales poblaciones de distintas especies interaccionan unas con otras. Las comunidades microbianas presentan algunos atributos característicos tales como la composición, la diversidad o dinámica poblacional necesarios para comparar diferentes hábitats o ecosistemas (Calderoli 2016). El sostenimiento y funcionamiento de los ecosistemas dependen en gran parte de la interacción de las comunidades microbianas, el compostaje se puede considerar como un ecosistema seminatural o artificial, ya que es un proceso complejo basado en la actividad e interacción de poblaciones microbianas sobre los desechos de origen orgánicos bajo condiciones aeróbicas, que tiene por objeto lograr el reciclaje de los desperdicios de una manera eficiente.

Durante el compostaje transcurre una serie de fases (mesófila I, termófila, mesófila II y de maduración o enfriamiento); la duración de cada una de estas depende de las condiciones físicas, químicas y biológicas del sustrato: la mezcla de sustratos, las condiciones de humedad, oxigenación, temperatura, el tiempo, y otros factores como el tamaño del inóculo, el pH, las tecnologías y la relación Carbono (C) y Nitrógeno (N). El comportamiento de las condiciones fisicoquímicas puede ocasionar cambios en la sucesión de las comunidades microbianas en la composta.

En la actualidad los estudios sobre la dinámica de las comunidades microbianas a lo largo del proceso de compostaje son escasos y/o limitados en cuanto a sus resultados, debido al uso de técnicas tradicionales de cultivo directo para el aislamiento e identificación de microorganismos; estas técnicas solo nos permiten aislar e identificar una pequeña fracción de los microorganismos existentes en este tipo de ambientes.



Actualmente existen alternativas más efectivas que nos permiten obtener resultados más amplios y exactos en cuanto a diversidad de poblaciones e identificación de microorganismos; las técnicas de análisis metagenómico para muestras ambientales nos permiten obtener información genética potencial sobre la estructura de las comunidades microbianas, nuevos biocatalizadores, enzimas, vínculos entre funciones genómicas y la filogenia de los organismos no cultivables (Thomas *et al.* 2012). Igualmente otras técnicas de biología molecular alternativas al análisis metagenómico basado en secuenciación permiten describir la diversidad de microorganismos en diferentes muestras ambientales, como también en las de compost (Adams y Frostick 2009).

Durante una de las fases del proceso de compostaje (termófila) se generan condiciones aptas para el desarrollo de microorganismos termófilos. En la actualidad, estos microorganismos y sus biomoléculas (enzimas) presentan un gran interés debido a la capacidad de soportar altas temperaturas, y su estabilidad frente a condiciones desfavorables. Por lo tanto, el potencial uso de estos microorganismos a nivel industrial y biotecnológico es muy alto (Champdore *et al.* 2007).

Por una parte, la naturaleza de las comunidades microbianas que colonizan y se desarrollan durante el proceso de compostaje en nuestro medio es desconocida. Por ende, la posibilidad de estudiar la diversidad y la dinámica de las poblaciones bacterianas durante dicho proceso nos permitirá llegar a determinar aquellos factores internos o externos (como por ejemplo sustrato de origen, humedad, pH, entre otras), que pueden llegar a influir en la estructura y diversidad de las diferentes comunidades. La comprensión de la microbiología del compostaje es fundamental para definir nuevos métodos de producción, y para mejorar el proceso y el producto final.

En el caso de nuestro país, los escasos estudios llevados a cabo sobre análisis de diversidad microbiana en el compostaje se han realizado en base al empleo de técnicas tradicionales de cultivo (Pucha *et al.* 2015); por ende, los resultados obtenidos se limitan a los microorganismos cultivables, lo cual introduce un sesgo inconveniente pues deja de lado la enorme mayoría de microorganismos no cultivables. Por lo tanto, se hace necesaria la implementación y aplicación de herramientas de biología molecular, como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), para el análisis de la diversidad y dinámica de las poblaciones bacterianas en muestras de compost.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- Estimar la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje a partir de dos sustratos, de desechos municipales y desechos agropecuarios, y aislar e identificar la presencia de bacterias termófilas en la etapa de mayor temperatura, mediante el empleo de herramientas de biología molecular.

### 2.2. Objetivos específicos

- Calcular la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas a lo largo del proceso de compostaje mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).
- Relacionar la diversidad y riqueza bacteriana con cada uno de los factores físicos, químicos y biológicos analizados durante el proceso de compostaje.
- Aislar bacterias termófilas mediante cultivos de enriquecimiento, e identificarlas mediante PCR y el polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (PCR-RFLP), y mediante secuenciación, a partir de muestras de compost de la etapa termófila, y establecer un bio-banco de organismos aislados.



### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Compostaje

La historia del compostaje comienza en la India, en el año de 1933, como una práctica de manejo de los desechos. A partir de ese año se publicaron los primeros documentos respecto a este proceso a partir de ahí se plantearon nuevas mejoras. En 1940 se introdujo la aireación como una alternativa para acelerar los procesos de degradación de los desechos. Y entre 1926 y 1941 se descubrió la importancia de la influencia de la temperatura sobre la tasa de descomposición de la materia orgánica, que a su vez dio paso al estudio de los factores que intervienen en este proceso (Diaz *et al.* 2007).

En términos generales, el compostaje es un proceso de biodegradación de una mezcla de sustratos orgánicos llevado a cabo por la comunidad microbiana, bajo condiciones aeróbicas y en estado sólido. (Strom 1985, Peters *et al.* 2000, Insam & Bertoldi 2007). Se define a la biodegradación como la ruptura de la estructura molecular de compuestos orgánicos complejos en componentes primarios (Insam & Bertoldi 2007).

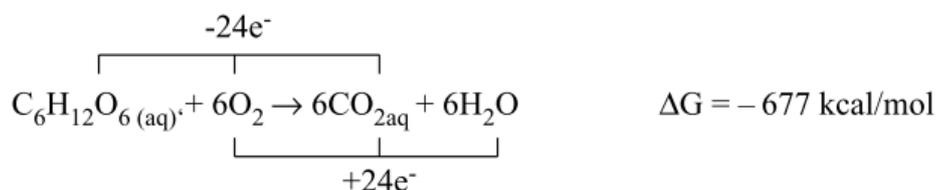
##### 3.1.1. Proceso de Compostaje

Durante este proceso transcurren una serie de fases. Durante la fase inicial, llamada mesófila, la temperatura alcanza de 25 a 40° C y tiene una duración de entre 24 a 72 horas dependiendo de la materia prima y sus condiciones de almacenamiento. Le sigue luego la fase termófila, donde se alcanzan temperaturas de 35 hasta 65° C, y que puede durar unos pocos días hasta algunas semanas dependiendo de la naturaleza del material. Para evitar un aumento excesivo de la temperatura (> 65° C) es necesario incorporar la composta, controlar la humedad, y así mantener condiciones homogéneas en todo el proceso. En tercer lugar se tiene la fase mesófila II, que ocurre cuando disminuye la temperatura hasta cercana a la ambiental. Esta fase puede durar de uno a dos meses. Y finalmente tenemos a la fase de maduración, que puede durar de uno a cuatro meses (Insam & Bertoldi 2007, Adams & Frostick 2009, Ivankin *et al.* 2014, Cegline & Abdelrahman 2014).



La duración de estas cuatro fases depende de las condiciones físicas, químicas y biológicas del sustrato, el porcentaje de sustratos, las condiciones de humedad, oxigenación, el tiempo, y otros factores como el tamaño del inóculo, el pH, el tamaño del material, las tecnologías y la R. C/N (Ceglie & Abdelrahman 2014).

La característica principal del proceso de compostaje es el auto-calentamiento, provocado principalmente por la actividad microbiana acelerada sobre la materia orgánica produciéndose la liberación de calor, este auto calentamiento es determinado por la degradabilidad y el contenido energético de los sustratos, así como la disponibilidad de humedad y Oxígeno (O), y el método de conservación de energía (radiación o por convección) (Insam y Bertoldi 2007, MacGregor *et al.* 1981).



Reacción de la actividad metabólica microbiana. Fuente: Ryckeboer *et al.* 2003

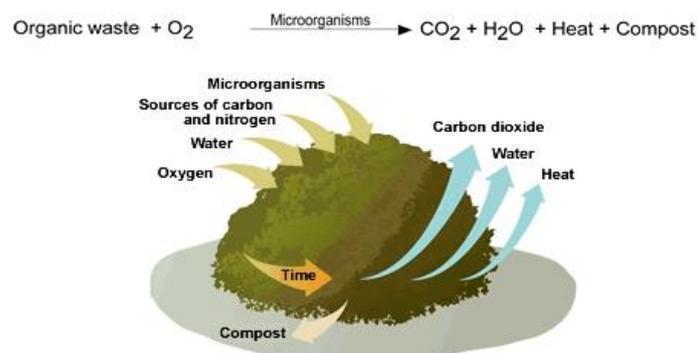
La actividad microbiana se relaciona con los porcentajes de C y N presentes en las materias primas usadas y con la velocidad de degradación de los compuestos orgánicos; los componentes de C sirven principalmente de fuente de energía para el mantenimiento y crecimiento microbiano, la cantidad de C incorporado en las células por unidad de C degradada está entre 10% a 35%, dependiendo de la naturaleza de los sustratos, la población microbiana y las condiciones ambientales (Ryckeboer *et al.* 2003).

Si la relación C/N es mayor a 40, la actividad biológica sobre los sustratos disminuye y los microorganismos deben oxidar el exceso de C, retardando el proceso debido a la baja disponibilidad de N para la síntesis proteica de los microorganismos, el N es un elemento crítico en el crecimiento microbiano; por otro lado si la relación C/N es muy baja, el compostaje es más rápido, pero el exceso de N se desprende en forma de gas amoniacal o por lixiviación de Nitrato, produciéndose una autorregulación de C y N. (Insam & Bertoldi 2007, Ceglie & Abdelrahman 2014, Antil *et al.* 2014, Ivankin *et al.* 2014). Se ha estimado que el intervalo óptimo para los sustratos debe ser entre 25 a 35 (Ceglie & Abdelrahman 2014, Antil *et al.* 2014, Ivankin *et al.* 2014). Durante el compostaje

la relación C/N tiende a disminuir significativamente por la pérdida de C en forma de  $\text{CO}_2$  a través de la respiración microbiana, mientras que el N es reciclado y no se pierde mayor proporción (Ryckeboer *et al.* 2003).

El pH puede actuar como un limitante para el desarrollo de ciertos microorganismos. De hecho, se ha establecido que en las primeras fases se producen altas cantidades de ácidos orgánicos, los cuales provocan la disminución del pH hasta valores ácidos, esto promueve la proliferación de hongos y levaduras y, como consecuencia de ello, se produce la amonificación aumentando el pH, que a su vez promoverá el metabolismo bacteriano de la siguiente fase (Ceglie & Abdelrahman 2014). Se ha estimado que el intervalo óptimo de pH para el desarrollo de las bacterias se encuentra entre 4.5 y 8.0 (Insam & Bertoldi 2007, Carbonell *et al.* 2011, Mostafid *et al.* 2012).

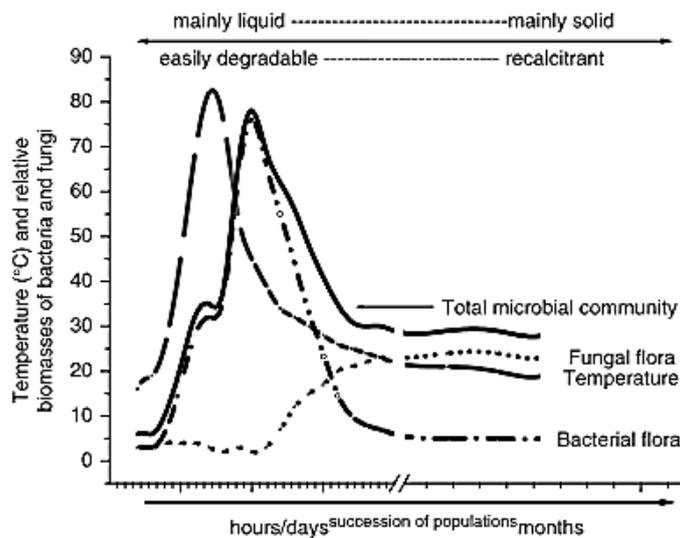
Por otro lado, es importante mantener una concentración de O de un 15 a 20% en el interior de la masa, y de  $\text{CO}_2$  de 0.5 a 5% para una adecuada fermentación de los sustratos (MacGregor *et al.* 1981). También se considera que el contenido de humedad en el material de partida debe estar alrededor de un 50 a 60% para obtener un producto estable y totalmente descompuesto, pues la actividad microbiana cesa cuando el contenido de humedad es inferior al 30% (Epstein 1997, Ryckeboer *et al.* 2003, Insam & Bertoldi 2007, Ivankin *et al.* 2014). El contenido de humedad puede usarse como un indicador de descomposición de la materia orgánica (Tiquia & Tam 2000). Tomando en consideración las condiciones ambientales y cada uno de los factores físico-químicos que influyen en el proceso de compostaje y el manejo del mismo, se puede decir que el tiempo promedio del proceso puede ir desde un mes hasta cuatro meses (Ivankin *et al.* 2014).



**Figura 1.** Factores que contribuyen a la formación del compost. Fuente: Martínez (2013)

### 3.1.2. Factores biológicos del proceso de compostaje

En cada una de las fases del proceso de compostaje predominan diferentes comunidades microbianas que desempeñan funciones específicas; la capacidad de los microorganismos para asimilar los diferentes sustratos orgánicos depende de la habilidad de producir enzimas específicas para degradar cada tipo de sustrato (carbohidratos, proteínas, lípidos y lignina) (de Bertoldi *et al.* 1983). El comportamiento de las comunidades microbianas durante el proceso de compostaje, en relación con la temperatura se presenta en la figura 2.

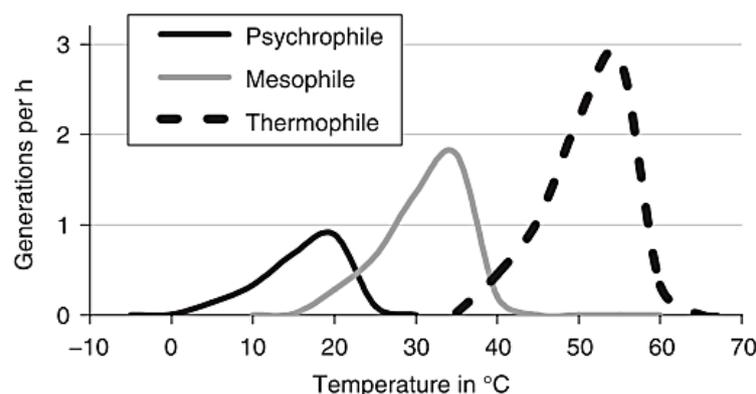


**Figura 2.** Comunidades microbianas durante el proceso de compostaje: relación a la temperatura. Fuente: Insam y Bertoldi (2007)

En la primera fase mesofílica es donde prevalecen altas poblaciones de hongos, Actinobacterias y bacterias, que son conocidos como descomponedores primarios. Estos microorganismos son los encargados de degradar rápidamente compuestos como azúcares y proteínas, algunos de los metabolitos producidos en esta fase pueden ser usados por la siguiente población microbiana (alimentación cruzada) (Insam & Bertoldi 2007). Las bacterias son el grupo más diverso de organismos en el compostaje, utilizando una serie de enzimas de degradación química de la variedad de sustratos orgánicos. De igual manera la rapidez de multiplicación bacteriana es mucho mayor permitiendo una rápida proliferación y dominio de los sustratos en comparación con los hongos, por lo tanto la cantidad de bacterias y Actinomicetos son mucho mayor que el resto de microorganismos (Ryckeboer *et al.* 2003, Insam & Bertoldi 2007).



A continuación se encuentra la fase termófila donde, como consecuencia del calor generado por la elevada actividad metabólica de los microorganismos durante la fase mesofílica, la estructura de la comunidad cambia en su totalidad (Ryckeboer *et al.* 2003, Insam & Bertoldi 2007, Klammer *et al.* 2008). Esta comunidad termófila es principalmente bacteriana; sin embargo, existen algunos hongos termo-resistentes que soportan temperaturas altas, pero inferiores a 65° C (Antil *et al.* 2014) en general la diversidad de especies bacterianas disminuye significativamente durante la fase termofílica. Durante la fase termofílica se continúan degradando ciertos compuestos a pesar de que la tasa de descomposición disminuye por la baja actividad microbiana (ej. Inactivación enzimática, disponibilidad de O<sub>2</sub>) (Hassen *et al.* 2001). Si se tiene un buen manejo en la aireación de la composta, esta fase continuara hasta que la tasa de generación de calor sea menor que la tasa de disipación de calor, debido al agotamiento de los sustratos fácilmente degradables (Ryckeboer *et al.* 2003). A esta fase se la considera también una fase higienizante; los Actinomicetos al competir con otros microorganismos por nutrientes pueden inhibir el crecimiento de microbios, entre ellos patógenos, debido a la producción de antibióticos, enzimas líticas o por el parasitismo; estos microorganismos son capaces de degradar polímeros naturales y colonizar los sustratos orgánicos después de que las bacterias y hongos han consumido las fracciones fácilmente degradables (Mahimairaja *et al.* 1995, Ryckeboer *et al.* 2003, Insam & Bertoldi 2007, Antil *et al.* 2014); si mayor es la temperatura alcanzada durante esta fase, mayor eficiente será la destrucción de patógenos (Ryckeboer *et al.* 2002). De acuerdo a Insam y Bertoldi (2007) la temperatura óptima para la fase termófila se debe encontrar aproximadamente a 60 °C. El rango de temperatura de los microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos, y su tiempo de generación se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Rango de temperatura de microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos, y su tiempo de generación. Fuente: Insam y Bertoldi (2007)



Durante la fase de refrigeración o enfriamiento (segunda fase mesófila), ya se han consumido todos los sustratos degradables por los organismos termófilos, por lo tanto los nutrientes se vuelven un factor limitante, causando el declive de la actividad microbiana y la generación de calor, razón por la cual la temperatura comienza a descender. Debido a ello, los microorganismos mesófilos con la capacidad de degradar almidón o celulosa vuelven a proliferar (Blanc *et al.* 1999, Insam & Bertoldi 2007); algunos aislados durante esta fase muestran actividades metabólicas interesantes involucradas en la oxidación del Hidrogeno (H), Amonio, Nitrito y Azufre (S), así mismo de fijación del N, reducción de Fosfato, producción de exopolisacáridos y de producción de Nitrito de amonio bajo condiciones heterotróficas (Díaz-Raviña *et al.* 1989, Beffa *et al.* 1996). Finalmente, en la fase de maduración la proporción de hongos aumenta mientras que la de bacterias disminuye; en esta fase se forman compuestos como lignina-humus, que no serán degradables (Insam & Bertoldi 2007). La mayor cantidad de hongos degradadores de celulosa y lignina se pueden aislar de esta fase (Von klopotek 1962). Bacterias relacionadas al género *Arthrobacter* se pueden considerar como indicadores de madurez ya que estos se encuentran en abundancia como parte de la flora bacteriana común de los suelos. Igualmente la diversidad microbiana parece estar relacionada con la estabilidad del producto final (Beffa *et al.* 1996) .

Como se mencionó anteriormente, las condiciones fisicoquímicas cambiantes ocasionan cambios en la sucesión de las comunidades microbianas en la composta (Ceglie & Abdelrahman 2014, Bhattacharya & Pletschke 2014). Bajo condiciones aeróbicas la temperatura es el factor determinante del tipo de microorganismos presentes así como la diversidad de especies y la tasa de actividad metabólica (Hassen *et al.* 2001). Se puede suponer que el sustrato, e inclusive el intercambio de electrones puede afectar el comportamiento de las comunidades microbianas (Peters *et al.* 2000, Adams & Frostick 2009). El ecosistema del proceso del compostaje se ve limitado debido a la inevitable acumulación de calor (Strom 1985); por otro lado se ha encontrado que los mayores índices de diversidad microbiana se encuentran a temperaturas que oscilan entre los 30 y 45° C (Díaz *et al.* 2007).

### **3.1.3. Diversidad bacteriana en la etapa termófila del proceso de compostaje**

Algunos estudios han revelado que los principales grupos bacterianos presentes al inicio del proceso de compostaje son mesófilas tales como *Lactobacillus spp.* y



*Acetobacter spp.* (Golueke *et al.* 1953, Ishii *et al.* 2000, Partanen *et al.* 2010). Durante la fase termofílica aparecen bacterias Gram positivas de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus* y algunas Actinobacterias, que se convierten en dominantes (Blanc *et al.* 1999, Insam & Bertoldi 2007, Partanen *et al.* 2010). Es en esta fase, donde las temperaturas rodean los 60° a 70°C, que se ha encontrado la menor diversidad de especies (Strom 1985, Ishii *et al.* 2000). Durante esta fase se estima que el número de bacterias termófilas y actinomicetos cultivables decrece a medida que la temperatura sobrepasa los 65° C (Li *et al.* 2014). El análisis de muestras obtenidas en la etapa termofílica muestra una gran abundancia de los Firmicutes, representados principalmente por miembros del género *Geobacillus*, ya que el rango de temperatura induce su selección (Takaku *et al.* 2006), para *Geobacillus stearothermophilus*, uno de los microorganismos más comunes de esta etapa, se sabe que a medida que la temperatura aumenta el espesor de las biopelículas acuosas disminuyen pudiendo afectar la actividad de estas bacterias (Ryckeboer *et al.* 2003). Igualmente se han logrado aislar bacterias de los géneros *Bacillus*, *Ureibacillus*, *Anureinibacillus*, y *Clostridium* durante esta fase (Li *et al.* 2014, Zeigler 2015). Y se ha determinado además que altas concentraciones de *Bacillus spp.* indican el cambio de la fase mesofílica a la termofílica (Partanen *et al.* 2010).

### 3.2. Análisis de las comunidades microbianas

El análisis de las comunidades nos permite entender la diversidad, la estructura, las funciones y el comportamiento espacial y temporal de los microorganismos de un medio (Calderoli 2016). Los análisis de diversidad microbiana generalmente se refieren a dos componentes de las comunidades, la estructura que es el número de diferentes especies (Riqueza) y a la “uniformidad” relativa del número de individuos de una muestra (Strom 1985).

El estudio de las comunidades microbianas puede incluir la identificación, tanto de los microorganismos cultivables como de los microorganismos no cultivables; estos últimos se pueden estudiar en base al análisis del metagenoma mediante técnicas moleculares. Para poder estudiar en profundidad estas comunidades y determinar su biodiversidad, se han aplicado diferentes técnicas de análisis. Entre ellas se encuentran las técnicas basadas en cultivo directo, que permiten aislar los microorganismos y estudiar sus propiedades a partir de cultivos en laboratorio. Para esto se usan medios de cultivo y/o de enriquecimiento, que permiten separar diferentes microorganismos a



través del uso de medios selectivos e incubándolos bajo condiciones específicas para cada uno de ellos. Por lo tanto, cabe recalcar la importancia del manejo de las condiciones de cultivo, ya que estas son fundamentales para el desarrollo de los mismos. (Madigan *et al.* 2009)

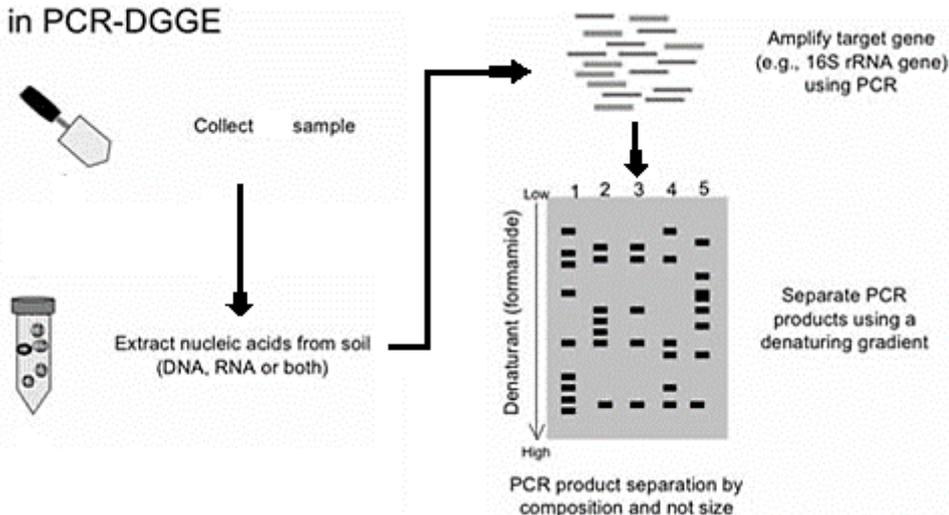
Los métodos microbiológicos clásicos, basados en el cultivo directo de los microorganismos, solo nos permiten identificar una pequeña fracción (<0.5%) de los microorganismos de los entornos naturales (Blanc *et al.* 1999, Madigan *et al.* 2009). A pesar de la viabilidad de algunos microorganismos, solo una pequeña fracción de estos son cultivables (Insam & Bertoldi 2007). Es por ello que los métodos de cultivo tradicionales no han permitido identificar la diversidad bacteriana de una manera amplia, debido a sus limitaciones relacionadas con la multiplicación de los microorganismos en los medios disponibles (Partanen *et al.* 2010).

Con la finalidad de superar las limitaciones que presentan los métodos tradicionales de análisis de comunidades microbianas, se han desarrollado nuevos métodos basados en el análisis genético. Estos métodos no requieren del aislamiento de los microorganismos sino, que están basados en el estudio –parcial o total- de sus genomas. Las técnicas moleculares más usadas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*), la electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*), el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA: *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), la secuenciación masiva, entre otros (Muyzer *et al.* 1993, Kuisiené *et al.* 2007, Madigan *et al.* 2009, Partanen *et al.* 2010).

La técnica de PCR permite la detección de secuencias específicas de ADN, aun cuando su abundancia sea muy escasa en muestras ambientales, y se fundamenta en la hibridación de una secuencia complementaria de un gen diana con dos cebadores (*Primers*) con el fin de generar un gran número de copias de esta secuencia. A través de una serie de ciclos sucesivos de separación de hebras complementarias, hibridación de los cebadores y polimerización se puede generar una serie de copias de la secuencia deseada. En general se suele trabajar con genes diana que codifican el ARN ribosómico de subunidad menor (16S ARNr) (Madigan *et al.* 2009); esta técnica se ha usado en una serie de investigaciones para la identificación de microorganismos termófilos, como los

del género *Geobacillus* (Kuisiene *et al.* 2007). A partir de los productos de amplificación generados por PCR (amplicones) se pueden discriminar las distintas especies de microorganismos a través de la técnica de DGGE (Figura 4). El principio de la misma se basa en separar fragmentos del mismo tamaño pero de diferente composición nucleotídica. Dichos fragmentos se pueden visualizar como diferentes bandas en un gel de DGGE. Una vez separadas las bandas, las mismas se pueden extraer del gel para secuenciarlas, pudiendo determinar así el número real y la identidad de las especies presentes en una muestra ambiental o hábitat (Madigan *et al.* 2009).

#### Steps in PCR-DGGE



**Figura 4.** Pasos para el análisis de comunidades microbianas por el método de PCR-DGGE.

Fuente: Gaona *et al.* (2012)

Las nuevas técnicas de biología molecular han permitido describir la diversidad de microorganismos presentes en diferentes muestras ambientales, y muy particularmente en las de composta (Adams & Frostick 2009). Mediante el uso de estas técnicas se ha podido revelar la existencia de secuencias genómicas correspondientes a nuevos microorganismos no-cultivables (Partanen *et al.* 2010). Técnicas como DGGE, polimorfismo de conformación de banda simple (SSCP: *Single Strand-Conformation Polymorphism*) y PCR-RFLP son algunas de las técnicas utilizadas para análisis de las comunidades microbianas de muestras de composta (Blanc *et al.* 1997, Ishii *et al.* 2000, Peters *et al.* 2000, Ishii & Takii 2003, Takaku *et al.* 2006, Adams & Frostick 2009, Partanen *et al.* 2010, Charbonneau *et al.* 2012, Karadag *et al.* 2013)

Además de la técnica de DGGE, tenemos la PCR-RFLP. Su principio se fundamenta en el reconocimiento de secuencias específicas a lo largo del ADN, por parte



de enzimas de restricción, y corte de las mismas, con el fin de generar un patrón específico de bandas en el gel de agarosa. Cada uno de estos patrones corresponde, teóricamente, a una cepa o a una especie en particular. Por ende, esta técnica se usa para identificar grupos particulares de microorganismos (Madigan *et al.* 2009). Para la identificación de bacterias termófilas, como las del género *Geobacillus*, se han empleado endonucleasas de restricción como *AluI*, una de las enzimas más frecuentes para su identificación, llegándose a identificar algunas especies de este género (*G. stearothermophilus*, *G. debilis*, *G. jurassicus*, *G. pallidus*, *G. tepidamans*, *G. thermoglucosidasius*, *G. toebii*, *G. uzenensis*, *G. vulcani*) (Kuisiené *et al.* 2007).

Aparte de los métodos moleculares anteriormente descritos, actualmente se ha dado un enfoque mucho más amplio al estudio molecular de las comunidades microbianas: la llamada genómica medioambiental o metagenómica. Esta estrategia de estudio se basa en la secuenciación masiva de la mayor cantidad de genes o marcadores moleculares, para posteriormente determinar el grupo filogenético al que pertenecen dichas secuencias (Madigan *et al.* 2009), estos análisis nos dan acceso a información funcional genética de las comunidades microbianas, dándonos una descripción más amplia que los estudios filogenéticos que únicamente se basa en la diversidad de un gen (16 S) (Thomas *et al.* 2012).

En la actualidad se considera a la secuenciación de Sanger como un método clásico para el análisis metagenómico de las comunidades microbianas, esto ha dado paso a la búsqueda de nuevos métodos basados en la necesidad de una metodología más rápida, fácil, económica, de alto rendimiento y eficaz; esto ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación independientes de clonación como es la pirosecuenciación, ya que permite la secuenciación de regiones técnicamente difíciles (que poseen una estructura secundaria rígida o con altos contenidos de Guanina-citosina). A su vez se han desarrollado tecnologías de nueva generación de secuenciación (NGS), que presentan muchas ventajas frente a la secuenciación tradicional tipo Sanger: no requieren una pre-amplificación del ADN, permite secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela a un precio mucho más barato por base; la secuenciación masiva posee el potencial de detectar todo tipo de variaciones genéticas como mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, así como variaciones estructurales como inversiones, translocaciones y duplicaciones (Thomas *et al.* 2012, Rodríguez-Santiago & Armengol 2012, Buermans & Dunnen 2014).



### 3.3. Usos e importancia biotecnológica de bacterias termófilas

Durante la última década la industria de la enzimología ha afrontado un gran crecimiento en los sectores de investigación, biotecnología y diagnóstico, generando una proyección de crecimiento de un 4.6 por ciento hasta el 2020 a \$7.2 billones. La mayoría de los fabricantes de enzimas buscan mejorar las condiciones de trabajo de sus enzimas con mayores rendimientos a condiciones desfavorables (pH extremos, bajas y altas temperaturas) (The Freedonia Group 2016)

Desde un punto de vista general, los microorganismos termófilos producen endoesporas resistentes que les permite sobrevivir a condiciones de vida desfavorables (Cihan *et al.* 2012). Estos microorganismos representan una fuente potencial para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos, principalmente los basados en el uso de sus enzimas y que requieran altas temperaturas de trabajo (Kuisiené *et al.* 2007, Champdore *et al.* 2007). Las enzimas aisladas a partir de ambientes extremos son consideradas muy útiles para varias aplicaciones, principalmente debido su actividad a altas temperaturas, pH extremos y/o altas concentraciones salinas (Champdoré *et al.* 2007).

El uso de estos microorganismos termófilos representa una alternativa válida frente a la inestabilidad de las biomoléculas de microorganismos mesófilos a altas temperaturas (Champdore *et al.* 2007, Olson *et al.* 2012). Ciertos organismos pertenecientes al género *Bacillus* y otros géneros relacionados (*Geobacillus* y *Ureibacillus*) poseen una gran importancia industrial debido a la versatilidad y capacidad de soportar ciertas condiciones como altos valores de pH y altas temperaturas (Cihan *et al.* 2012). El aislamiento de *Bacillus* y *Geobacillus* sp. ha permitido el desarrollo de una nueva generación de biocombustibles (Bhattacharya & Pletschke 2014); en la actualidad se han patentado enzimas termoestables, especialmente amilasas y pululanasa, provenientes de *Geobacillus stearothermophilus* (Marchant & Banat 2010).

La principal ventaja de los microorganismos termófilos es su capacidad de sintetizar enzimas termoestables con una alta estabilidad operacional y un tiempo de vida largo. Las enzimas aisladas de estos microorganismos son usualmente resistentes a la acción de desnaturalizantes químicos, detergentes, agentes caotrópicos y solventes orgánicos, por lo que se pueden usar como modelos de biomoléculas para el diseño de



proteínas de interés industrial (D'Auria *et al.* 1997, 1998, Champdore *et al.* 2007); Las enzimas lipolíticas son un grupo importante de enzimas, que también pueden ser aisladas a partir de microorganismos termófilos (*B. stearothermophilus*). Estas enzimas son aplicables en la industria alimenticia, de detergentes, de aceites y grasas, en la cosmética y farmacéutica. Su alto potencial biotecnológico se debe a la estabilidad de estas enzimas frente a solventes orgánicos y capacidad de trabajo a temperaturas cercanas a 45° C (Sifour *et al.* 2010); dentro de aplicaciones biotecnológicas para enzimas de medios termófilos se incluye el uso de amilasa para la producción de glucosa y xilanas para el blanqueamiento del papel, igualmente se pueden obtener celulasas para la obtención de glucosa (Kwon *et al.* 2010); también se han usado enzimas de estos medios para la construcción de nano-sensores ópticos y que se basan en la capacidad de estas enzimas para enlazar sustratos a temperatura ambiente sin sufrir transformación alguna (Champdore *et al.* 2007), las proteasas abarcan más del 60% del mercado global de enzimas (Adrio & Demain 2014).

**Tabla 1:** Ejemplos de aplicaciones industriales de enzimas provenientes de microorganismos termófilos (Van den Burg 2003)

<b>Tipo</b>	<u>Características de crecimiento</u>	<u>Enzimas</u>	<u>Aplicaciones</u>
<b>Termófilos</b>	60 - 80° C	Proteasas	Los detergentes, hidrólisis de los alimentos y alimentación, la producción de bebidas, hornear
		Glicosil Hidrolasas (ejem. Amilasas, pullulanasas, glucoamilasas, glucosidasas, celulasas, xilanasas)	Procesamiento del almidón, celulosa, quitina, pectina y en los textiles.
		Quitinasas	Modificación de quitina para alimentos y productos para la salud
		Xilanasas	Blanqueamiento del papel
		Lipasas, estererasas	Detergentes, reacciones estéreo-específicas (p. ej. Trans-esterificación, biosíntesis orgánico)
		DNA Polimerasas	Biología Molecular (p. ej. PCR)
		Deshidrogenasas	Reacciones de oxidación

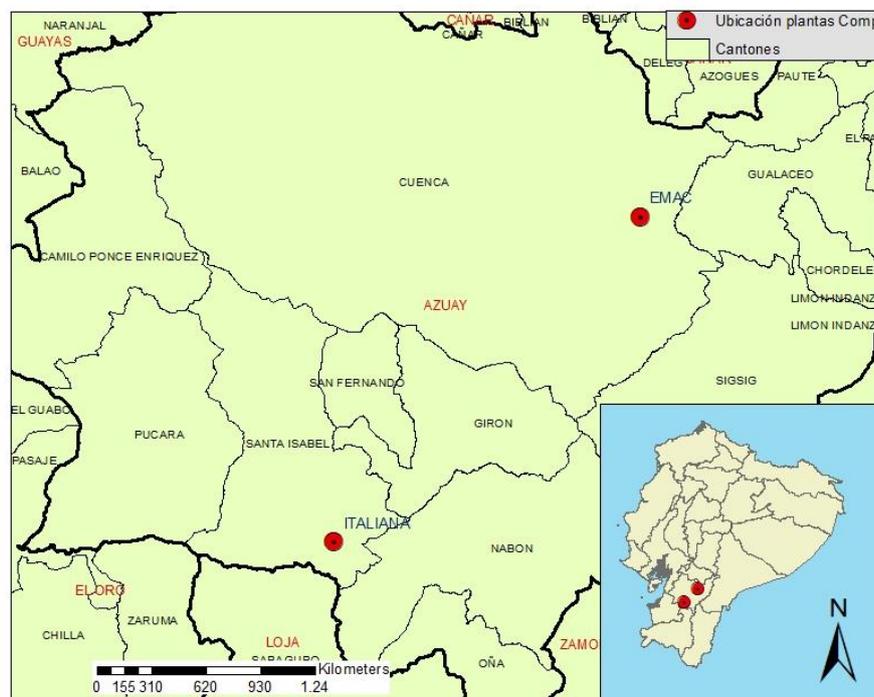
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Área de Estudio

El área de estudio está ubicada dentro de la zona 6, región Sierra, en la Provincia del Azuay, en dos plantas productoras de compost; la planta de la Emac **(A)** del cantón Cuenca, y la planta de La Italiana **(B)** del cantón Santa Isabel. En las siguientes coordenadas:

**Tabla 2.** Datos generales de ubicación de las Plantas de compostaje.

Planta	Coordenadas UTM	Altitud (ms.n.m.)	Temperatura media (° C)	Sustrato primario	Sustrato secundario
Emac	727 347.1 E, 9674 910.5 N	2677	16	Deshechos municipales	Deshechos varios (Podas, aserrín, Arena, Material compostado)
La Italiana	688 207.9 E, 9633 474.3 N	1045	30.8	Estiércol de Cerdo	Bagazo de caña



**Figura 5:** Localización a nivel provincial y cantonal de las plantas de compostaje en estudio; Fuente: SIN



## 4.2. Área de Ejecución del proyecto

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Biología Molecular e Hidrofísica de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, durante los meses de Mayo a Diciembre del 2017.

## 4.3. Colecta, conservación, transporte, almacenado de las muestras de Composta

Los materiales y métodos para la colecta en campo están basados según lo descrito por Insam y Bertoldi (2007) y aplicados para las dos plantas productoras de composta. Para la preservación de las muestras se empleó el método determinado por Mitchell y Takacs-Vesbach (2008).

Se tomaron un total de 20 muestras entre las dos plantas de compostaje (EMAC (11) y La Italiana (9)) desde el inicio del proceso de compostaje hasta el final del mismo. Las muestras (1.5 kg/c.u.) y la temperatura interna se tomaron a 50 cm de profundidad de la superficie de la pila de compost a partir de dos submuestras (750 g/c.u.) de diferentes sitios de muestreo a lo largo de los camellones de compost; éstas se almacenaron en fundas herméticas y se transportaron en un *cooler* para mantener su temperatura. Una vez en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de CCAA de la Universidad de Cuenca, las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su análisis.

- **Metodología para la consecución del objetivo 1**

## 4.4. Procesamiento de las muestras biológicas colectadas

### 4.4.1. Extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) metagenómico total

Para la extracción y purificación del ADN metagenómico total se empleó el kit Powersoil® DNA isolation kit (Ref. 12888-100) (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 1). La calidad del ADN metagenómico purificado fue determinada mediante electroforesis en gel de Agarosa (Ref. 16500) al 1 % (p/v), empleando SYBR Green (Ref. S7563) para la tinción y visualizadas en un transiluminador UV (E-Gel® Imager System), posteriormente las muestras fueron



almacenadas en tubos de 2 ml a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para garantizar la pureza del ADN y eliminar posibles inhibidores (ácidos húmicos), se usó el kit de purificación PureLink™ Quick gel extraction (REF. k210012 Invitrogen) (Anexo 2) usando una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  del ADN total de cada muestra.

El ADN purificado se cuantificó con el kit Qubit® dsDNA BR assay (Invitrogen) en el equipo Qubit® 2.0 fluorometer de acuerdo al manual (MAN.0010876) (Anexo 3)

#### 4.5. Amplificación de marcadores moleculares bacterianos mediante la reacción de PCR convencional

A partir de las muestras de ADN metagenómico purificado, se amplificó la región codificante para el marcador ARNr 16S, se realizó un PCR tipo *touchdown* (TD-16S) utilizando cebadores universales para bacterias F968-GC (5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') y 1401R (5' -CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') (Brons & van Elsas 2008). Se añadió una cola de GC al cebador F968 respectivamente, para evitar la desnaturalización completa de los fragmentos amplificados.

**Tabla 3:** Reactivos y concentraciones usadas en la reacción de PCR convencional.

REACTIVOS	CONCENTRACION FINAL
Platinum PCR Supermix	1X
Cebador F968-GC	10 $\mu\text{M}$
Cebador 1401 R	10 $\mu\text{M}$
ADN metagenómico	
Agua Grado biología molecular	

La preparación de los reactivos y la mezcla de cada PCR se realizó en una cabina de PCR Air science, y la reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador Eppendor mastercycler® modelo nexus GSX1. La mezcla de reacción, para un volumen total de 25  $\mu\text{l}$  fue: 22,5  $\mu\text{l}$  de solución Platinum PCR Supermix (Ref.11306-016 Invitrogen), 0,5  $\mu\text{l}$  de cada cebador y 1  $\mu\text{l}$  de ADN metagenómico y 0,5  $\mu\text{l}$  de Agua grado biología molecular (Ref. 10977-015 Invitrogen).

El perfil térmico usado fue el descrito por Brons y van Elsas (2008): una desnaturalización inicial de 5 min a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; seguido por 10 ciclos de



desnaturalización (touchdown) de 1 min a 94 °C, 1 min a 65 °C y 2 min a 72 °C con una disminución en la temperatura de hibridación de 1 °C por ciclo; seguido por 25 ciclos de hibridación de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C; seguido de una extensión final de 30 min a 72 °C. Además se incluyó para cada reacción de PCR un control negativo, el cual consistía en colocar una reacción sin ADN.

La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) empleando SYBR Green para la tinción y visualizadas en un transiluminador Molecular imager gel DOC™ XR+ (Bio-Rad laboratories Ltd.), los productos amplificados fueron almacenados en tubos de PCR a 4 °C hasta su uso.

Posteriormente se cuantificó la cantidad del ADN obtenido de la amplificación con el kit Qubit® dsDNA BR assay (Ref. Q32850 Invitrogen) en el equipo Qubit® 2.0 fluorometer, esto se realizó con el fin de llevar a todas las muestras a una misma concentración antes del DGGE, para poder relacionar intensidad de bandas en el DGGE con la cantidad de una población en específico; todas las muestras se llevaron a la menor concentración obtenida para cada una de las plantas (Anexo 4).

#### **4.6. Separación y fotodocumentación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)**

Para la separación de los productos amplificados del ARNr 16S mediante DGGE se usó un protocolo descrito por Fernández y Le (1987) y previamente optimizado por personal del Laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, para muestras de suelo. En nuestro caso preparamos un gel de poli(acrilamida) [7 % (p/v) de acrilamida: bis acrilamida (37.5:1) (Cat. 161-0148)], la polimerización se realizó con TEMED (Cat. 161-0801) relación 1:2 y per sulfato de Amonio (APS) (Cat.161-0700) al 10 % (p/v) relación 1:6 en un buffer TAE 0,5x. Las soluciones contenían un intervalo desnaturalizante de 35 % al 55 % [100 % desnaturalizante contiene Urea 7 M (161-0730) y 40 % (v/v) de Formamida ultrapura]. Para cada gel se usó un *staging* o “tapón” de acrilamida al 7 % sin desnaturalizante tanto para la parte inferior como en la parte superior.



Para la Electroforesis se preparó y ensamblo el equipo Dcode™ Universal mutation detection system (Bio-Rad laboratories Ltd.), bajo las instrucciones del fabricante. Para cargar las muestras se usó una mezcla de 3 µl de BlueJuice 6X (Ref. R0611 Invitrogen) y 15 µl de producto amplificado, se usó un marcador correspondiente a la muestra 1067 de la planta de compostaje **A**. La electroforesis se realizó en un tampón TAE 0.5X, se corrió a 100 V a 60 °C durante los primeros 10 min (corrida de prueba) y posteriormente a 80 V a 60° C durante 16 horas. El gel se tiñó con una solución de SYBR Green 2X durante 30 min, y las imágenes se visualizaron en un transiluminador Molecular Imager®™ XR+ imaging System (Bio-Rad laboratories Ltd.).

#### 4.7. Análisis de los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida

Una vez obtenidos los perfiles generados por el DGGE, se determinó la riqueza y la diversidad de Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs) mediante el índice de Shannon-Weaver. Para ello se empleó el software Gel Analyzer 2010 (Url: <http://gelanalyzer.com/>). Para el análisis filogenético tipo clúster de las comunidades bacterianas e identificar agrupaciones naturales entre los individuos empleamos el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*). Para construir cladogramas o dendogramas se empleó el software BioNumerics 7.6 (Url: <http://www.applied-maths.com/bionumerics?title=h1>).

Para determinar el índice de Shannon-Weaver (**H**) se usaron los valores de “Raw volumen” calculados automáticamente en el software Gel Analyzer, con estos datos se obtuvo el valor de la abundancia relativa ( $p_i$ ) correspondiente a la intensidad de una banda en específico. Con esto pudimos aplicar la fórmula:

$$[H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i]$$

Donde

S = Número de bandas en cada carril

$p_i$  = Proporción entre la intensidad de una banda específica y la suma de la intensidad de todas las bandas de un mismo carril,



El valor de  $S^*$ , corresponde a la riqueza específica, y la intensidad de cada banda corresponde a la abundancia de individuos por especie, la sumatoria de todas las intensidades determinó el valor del índice de Shannon-Weaver.

- **Metodología para la consecución del objetivo 2**

#### **4.8. Análisis físico y químico de las muestras de composta**

##### **4.8.1. Análisis del contenido de humedad**

Una parte de las muestras se destinaron a la determinación del contenido de humedad, después de ser tamizadas (tamiz 2 mm) y secadas a 105 °C por 24 h, la humedad de una muestra es la diferencia expresada en porcentaje entre el peso de la muestra húmeda (100 g) y el peso de la muestra seca:

$$w = (W_w - W_s) (\%)$$

Donde:

w = Contenido de humedad expresado en %

$W_w$  = Peso de la muestra húmeda (100 g)

$W_s$  = Peso de la muestra seca

##### **4.8.2. Análisis de conductividad eléctrica (Ce) y concentración de iones Hidrógeno (pH)**

Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Hidrofísica de Suelos. La conductividad eléctrica se determinó mediante disolución de muestra seca en agua destilada; en 50 ml de agua destilada se añadió 10 g de muestra (secada a temperatura ambiente y sin exposición al Sol), se homogenizó durante 20 min con ayuda de un plato agitador. Se filtró la suspensión con ayuda de un papel filtro y un embudo; el líquido obtenido se usó para medir la conductividad eléctrica por medio de un conductímetro. Para el pH se usó una disolución de 10g de muestra seca en 100ml de agua destilada, de igual manera se homogenizó durante 20 min y con ayuda de un potenciómetro se obtuvo el valor de pH.



Para la Ce se trabajó en una relación 1:5 de peso/volumen.

*10 g de compost: 50 ml de agua destilada*

Para el pH se trabajó en una relación 1:10 de peso/volumen.

*10 g de compost: 100 ml de agua destilada*

(Tiquia & Tam 2000)

#### **4.8.3. Análisis de materia orgánica**

El contenido de materia orgánica (M.O.) se determinó mediante el método de ignición. Se tomó 7 g de cada muestra secadas en la estufa a 105 °C por 24 h se ingresaron en la mufla donde se calentó a 400 °C durante 16 h. Una vez que las muestras estaban frías se pesó el residuo. La M.O. (%) es el resultado de la diferencia del peso antes de la ignición y el peso después de la ignición.

$$M.O. (\%) = [(p_i - p_f) * 100] / p_i$$

Donde:

M.O.= Materia orgánica expresada en %

Pi = Peso inicial de la muestra

Pf = Peso final de la muestra

#### **4.8.4. Cálculo de Carbono orgánico (C org.) del compost**

Para obtener el carbono orgánico del compost se usó la fórmula:

$$C.O. (\%) = 0.58 * M.O. (\%)$$

Donde:

C.O. = carbón orgánico expresado en %

M.O. = materia orgánica en %

0.58= constante de MO

(Guo y Gifford 2002)



#### 4.8.5. Cálculo de Relación Carbono-Nitrógeno (R. C/N)

La relación Carbono y Nitrógeno nos indica el número de unidades de C por unidad de N que hay en una muestra. Para obtener la relación C/N de las muestras se usó la fórmula:

$$C/N = C.O.(\%)/Nt(\%)$$

Donde:

C/N= Relación Carbono y Nitrógeno

C.O. = Carbón orgánico expresado en %

Nt = Nitrógeno total expresado en %

Para los análisis de contenido mineral se enviaron aproximadamente 1 kg de muestra al laboratorio de Suelos de la estación Experimental de Santa Catalina del INIAP, donde se obtuvieron los datos de Nitrógeno total (Nt), Fosforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre.

#### 4.9. Análisis estadístico

Para observar la distribución de las variables se realizó el test de Shapiro-Wilks, aquellas variables que no cumplieron con una distribución normal se realizó una transformación algorítmica “*Two step transformation*” (Templeton 2011), y se continuó con los análisis para variables paramétricas; para aquellas variables que no se puedan transformar se usaran pruebas no paramétricas (Anexo 5).

Para determinar diferencias estadísticas entre las variables se realizó una prueba de independencia u homogeneidad “Estadístico de Levene” para cada variable estudiada (Anexo 5): temperatura, pH, conductividad eléctrica, contenido de humedad, materia orgánica, contenido de carbono orgánico, contenido de N, P, K, Ca, Mg, S, R. C/N, tipo de sustrato usado, Riqueza e índice de diversidad, para esto se usó el paquete estadístico Software IBM SPSS statistics 23.0.

Para contrastar las variables de las características físico-químicas de la composta, riqueza y diversidad respecto al tipo de sustrato de cada una de las plantas estudiadas,



se fundamentó en una prueba de *t de Student* ( $p < 0,05$ ) para muestras independientes, para la variable R. C/N, se procedió con un test no paramétrico de *U Mann-Whitney* ( $p < 0,05$ ) debido a que la transformación modificaba sus medias (Anexo 5).

Así mismo se analizaron las posibles relaciones entre las variables con un test de correlación paramétrico de R de Pearson ( $p < 0,05$ ) (Anexo 6). Las variables de estudio utilizadas fueron: características físico-químicas del suelo y la riqueza y diversidad, y un test no paramétrico *Rho de Spearman* para la variable de R. C/N (Anexo 7).

- **Metodología para la consecución del objetivo 3**

#### **4.10. Cultivo, aislamiento y purificación de bacterias termófilas de las muestras de compost.**

Para el cultivo de las muestras se eligieron los medios más eficaces para bacterias termófilas; medio LB (Luria-Bertani) y medio AN (Agar nutritivo) (Li *et al.* 2014). Se realizó una disolución de muestra fresca (2 g) en  $\pm 10$  ml de agua destilada estéril, se homogeneizó mediante agitación durante 10 min, con una aza bacteriológica se tomó un poco de suspensión y se dispersó en la superficie de cada medio. Las muestras se incubaron a 55 °C durante 24 h y la dilución se guardó a -80 °C.

Los cultivos que evidenciaban la presencia de crecimiento de colonias a las 24 h se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el aislamiento de las mismas. Del total de colonias se escogieron las que presentaban mayor crecimiento, aproximadamente 2 colonias por caja, por medio de cultivo y por muestra. Las colonias se purificaron mediante repiques, una vez que se obtuvo el cultivo puro se procedió a sembrar las mismas en medios líquidos con las mismas concentraciones nutricionales que los medios sólidos, LB líquido y caldo nutritivo NB (por sus siglas en inglés *Nutrient broth*).

Una vez con los cultivos puros se prepararon los Crioviales (Cat. 5000-0020 Nalgene) estériles con 200  $\mu$ l de Glicerol (Sigma-Aldrich), a este se añadió 800  $\mu$ l del cultivo líquido puro de cada una de las colonias aisladas. La relación usada fue 1:5 de Glicerol y medio de cultivo respectivamente. Finalmente se guardaron a -80 °C por duplicado.



#### 4.11. Extracción de ADN de las bacterias termófilas

La extracción de ADN de las bacterias termófilas se realizó a partir de los cultivos puros en medios líquidos, se recolecto la biomasa centrifugando 2 ml de medio de cultivo con bacterias a 12000 x G durante 10 min, el pellet se conservó a -20 °C hasta su uso en la extracción del ADN total. Para la extracción se usó el método descrito previamente por Durand *et al.* (2015) con ciertas modificaciones. La biomasa colectada se suspendió en 475 µl de buffer de extracción [1.7 % Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (Ref. 71725), 200 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl]. Esta suspensión se incubó durante 30 min a 55 °C con 25 µl de proteinasa K (10 µg µl<sup>-1</sup>) (Ref. P2308 Sigma Aldrich). Para eliminar el exceso de ARN en las muestras se utilizó 2 µl de ARNasa (Ref. R6513) (20 µg µl<sup>-1</sup>) y se incubó a 37 °C durante 30 min. La extracción de ADN se realizó con un volumen de fenol cloroformo (Ref. 77619 Sigma-Aldrich), se centrifugo y se extrajo la fase acuosa con cuidado. La fase acuosa se precipito con un volumen de etanol absoluto frio (Ref. E7148 Sigma-Aldrich). Luego de centrifugar, el pellet se lavó con etanol al 70% (v/v) y finalmente se retiró el exceso de alcohol y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se disolvió en 30 µl de agua estéril Milli-Q y se almaceno a -20 °C.

#### 4.12. Identificación de las bacterias termófilas

##### 4.12.1. Amplificación de marcadores moleculares bacterianos mediante la reacción de PCR convencional

A partir del ADN extraído anteriormente, se amplificó la región codificante para el marcador ARNr 16S, se realizó una PCR utilizando cebadores universales para bacterias 27F (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1495R (CTACGGCTACCTTGTTACGA) (Kuisiené *et al.* 2007)

**Tabla 4:** Reactivos y concentraciones usadas en la PCR (2)

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL
Platinum ® PCR Supermix	1X
Cebador 27F	10 µM
Cebador 1495 R	10 µM
ADN extraído	
Agua Grado biología molecular	



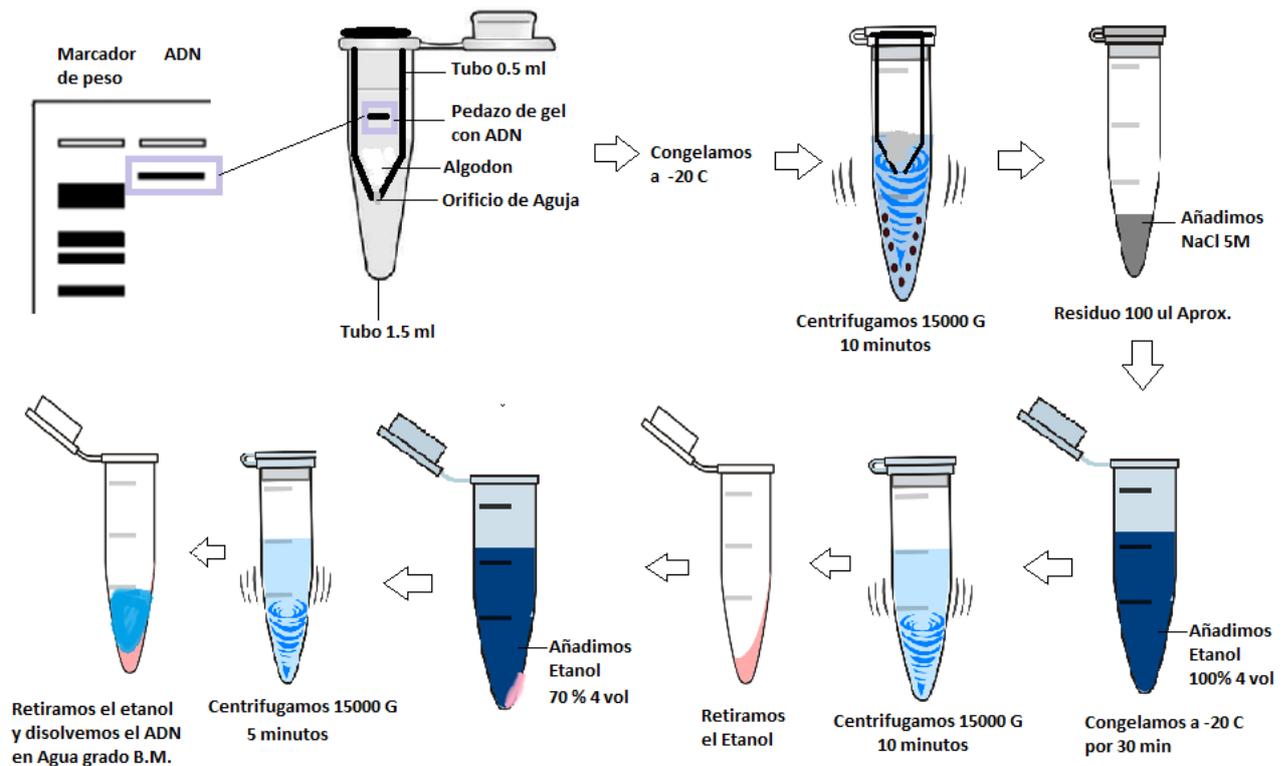
La preparación de los reactivos y la mezcla de cada PCR se realizó en una cabina de PCR Air science, y la reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador Eppendor mastercycler® modelo nexus GSX1. La mezcla de reacción, para un volumen total de 25  $\mu$ l fue: 22,5  $\mu$ l de solución Platinum PCR Super Mix (Ref.11306-016 Invitrogen), 0,5  $\mu$ l de cada cebador y 1  $\mu$ l de ADN metagenómico y 0,5  $\mu$ l de agua grado biología molecular (Ref. 10977-015 Invitrogen).

El perfil térmico usado fue el descrito por Kuisiené *et al.* (2007): una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 1 min a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y una extensión de 1 min a 72 °C y una final de 5 min a 72 °C. Además se incluyó para cada reacción de PCR un control negativo, el cual consistía en colocar la reacción sin ADN.

La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) empleando SYBR Green para la tinción y visualizadas en un transiluminador Molecular imager gel DOC™ XR+ (Bio-Rad laboratories Ltd.). Los productos amplificados fueron almacenados en tubos de PCR a 4° C hasta su uso.

#### **4.12.2. Purificación del producto de PCR**

Para purificar el producto de PCR se usó el método previamente expuesto por Sun *et al.* (2012), Para esto se usó un tubo de 500  $\mu$ l con un agujero en el fondo realizado con una aguja tamaño 22, se colocó una pequeña cama de algodón estéril al fondo del tubo y este se colocó dentro de un tubo de 1.5 ml (figura 6). Una vez que tuvimos el gel de electroforesis en el que migraron las bandas previamente amplificadas, se realizó el corte de las mismas procurando incluir solo la banda deseada, el pedazo de gel obtenido fue colocado en el tubo de 500  $\mu$ l, se congeló durante 1-2 h a -20 °C y posteriormente se centrifugó a 15000 G por 10 min, el residuo (100  $\mu$ l aprox.) se purificó con NaCl 5M (1:10 v/v), se añadió etanol absoluto para precipitar el ADN (4:1 v/v), se incubó durante 30 min a -20 °C. Luego de centrifugar, el pellet se lavó con etanol al 70 % (v/v). Se retiró el exceso de alcohol y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se disolvió con 20  $\mu$ l de agua estéril grado biología molecular y se almacenó a -20 °C.



**Figura 6:** Protocolo manual para purificación de producto de PCR.

#### 4.12.3. Corte del producto de PCR con la enzima de restricción *AluI*

Una vez que tenemos el producto de PCR purificado se procedió a realizar el corte del producto de PCR mediante la enzima de restricción tipo *AluI* (Cat. ER0012 Thermo Scientific™) bajo las instrucciones del fabricante. A partir del producto amplificado se preparó una alícuota de  $10\text{ }\mu\text{l}$ , se añadió  $1\text{ }\mu\text{l}$  de buffer Tango 10X (Cat. BY5 Thermo Scientific™) y  $1\text{ }\mu\text{l}$  de enzima *AluI* (Kuisiené *et al.* 2007). La mezcla se incubó por 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$  para que la enzima actué, para inactivar la enzima se incubó en baño María a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 20 min, esto evitó problemas en la electroforesis. El producto de la digestión se analizó mediante electroforesis en gel de Agarosa al  $1.6\%$  (p/v) empleando SYBR Green para la tinción y visualizadas en un transiluminador Molecular imager gel DOC™ XR+ (Bio-Rad laboratories Ltd.).

#### 4.12.4. Interpretación de los perfiles de restricción

Para la interpretación de los resultados, se compararon los patrones de restricción obtenidos en la electroforesis con aquellos definidos para cada especie, con ayuda del



software Serial Cloner 2.6.1. (Url: <http://serialbasics.free.fr/Home/Home.html>) Y secuencias obtenidas del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para el análisis filogenético tipo clúster de los aislados bacterianos e identificar agrupaciones naturales entre los individuos empleamos el método de agrupamiento UPGMA. Para construir cladogramas o dendogramas se empleó el software BioNumerics 7.6.

Los patrones de restricción de los microorganismos que presentaban diferencias significativas entre ellos, se enviaron a secuenciar para verificar la especie.

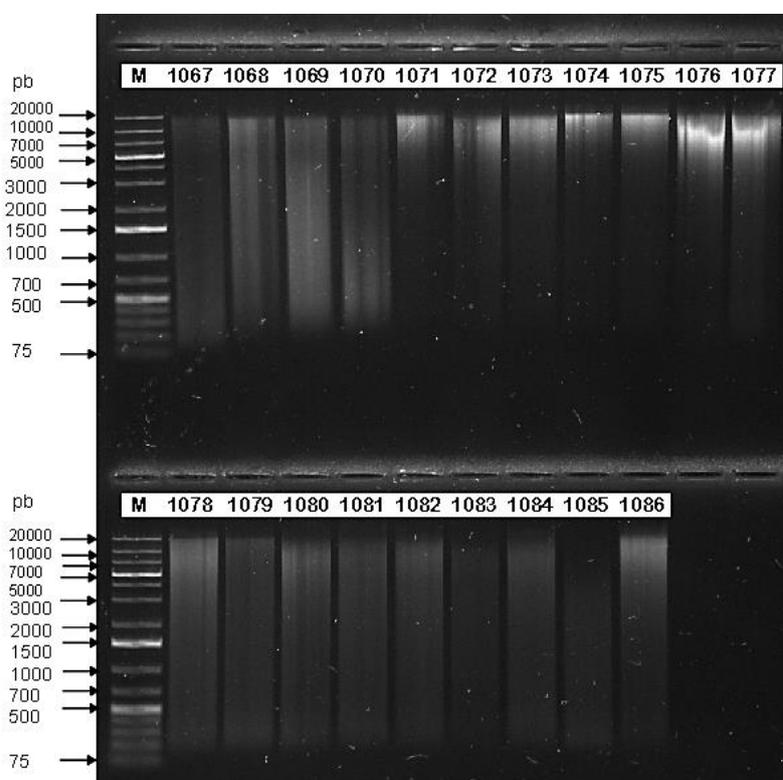
Del producto de PCR de la región 16S de ARNr con los primers 27F y 1495R, se envió 20 µl para purificación y secuenciación tipo Sanger, a la empresa Macrogen (Url: <http://www.macrogen.com>). Los resultados de la secuenciación se compararon con el GenBank usando el software Blast (*Basic Local Alignment lignment Search Tool*), donde se identificó los microorganismos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Extracción del ADN metagenómico

Para verificar la calidad de la extracción del ADN metagenómico se realizó la electroforesis en gel de Agarosa. (Figura 7). Se usó 5  $\mu$ l de ADN total y una escalera de 1 Kpb (Kilopares de bases) para confirmar que la longitud de los fragmentos de ADN extraídos estaba entre 10000 y 20000 pares de bases (pb). Igualmente para verificar la cantidad de ADN extraído se cuantifico en el fluorometro Qubit® 2.0. (Anexo 3). En general la calidad de la extracción fue adecuada. En cuanto a la cuantificación se obtuvieron valores desde 0.00263  $\mu$ g/ $\mu$ l hasta 0.0512  $\mu$ g/ $\mu$ l, lo que nos demuestra que hay una cantidad suficiente de ADN para proceder con la amplificación.

Para evitar la presencia de inhibidores (ácidos húmicos) que puedan afectar la amplificación, se purificó usando el kit PureLink™ Quick gel extraction para que las muestras estén aptas para la amplificación.



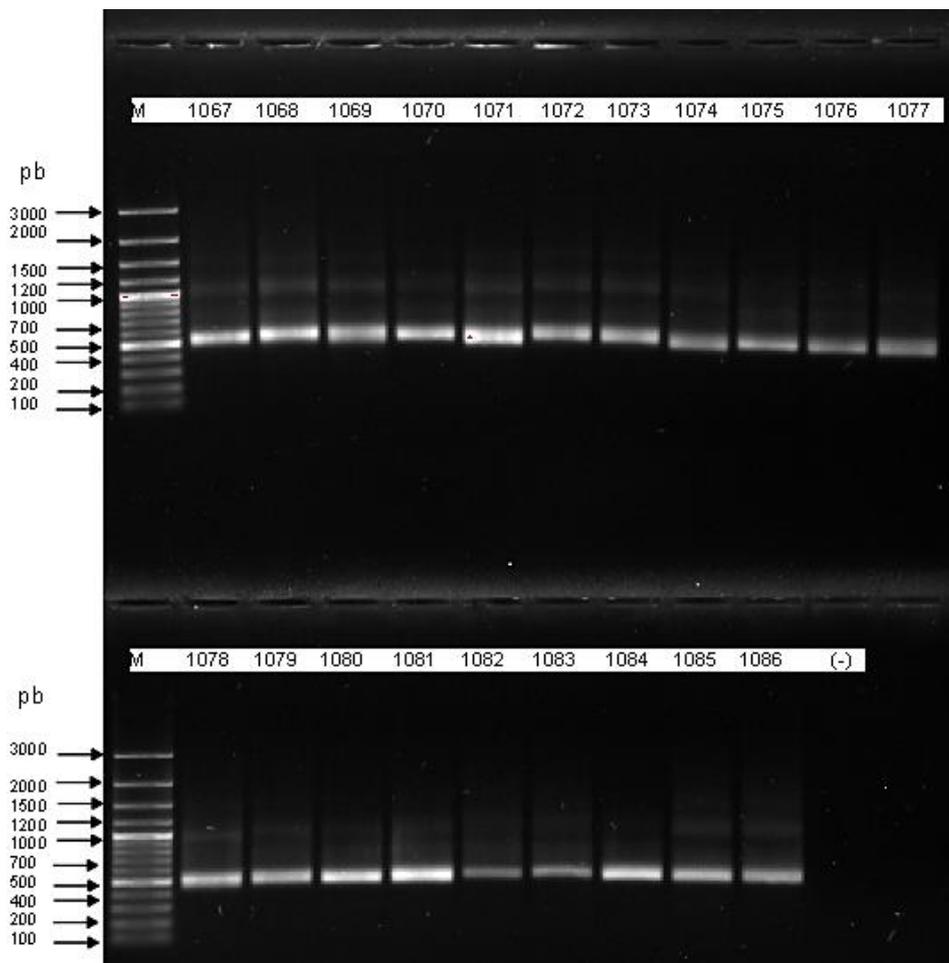
**Figura 7.** Electroforesis en gel de Agarosa (1% p/v) del producto de extracción de ADN metagenómico de las muestras de compost: 67-77 Planta A y 78-86 Planta B. Línea M, Generuler™ 1 Kpb plus DNA Ladder (Fermentas).

El producto de la extracción de ADN de cada una de las muestras se conservó en viales a -20° C.

## 5.2. Amplificación del ADN bacteriano de la región del ARNr 16S.

La amplificación del ADN bacteriano se muestra en la Figura 8, la imagen de la electroforesis mostró bandas en cada una de las muestras, correspondientes a los fragmentos amplificados con los cebadores F968GC-1401R (5 µl de cada muestra) con una longitud aproximada de 500 pb. Se observa que las bandas son intensas, lo que demuestra una buena amplificación.

Para poder observar la dinámica bacteriana de cada una de las Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs), mediante DGGE, las concentraciones de las muestras de ADN se diluyeron hasta el nivel de la que registró el menor valor de concentración en la cuantificación. Anexo 4.



**Figura 8.** Amplificación por TD-PCR del ARNr 16S con los cebadores F968GC-1401R sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas cercanas a 500 pb aproximadamente. Línea M, Generuler™ 100 pb plus DNA Ladder (Fermentas).



### 5.3. Separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

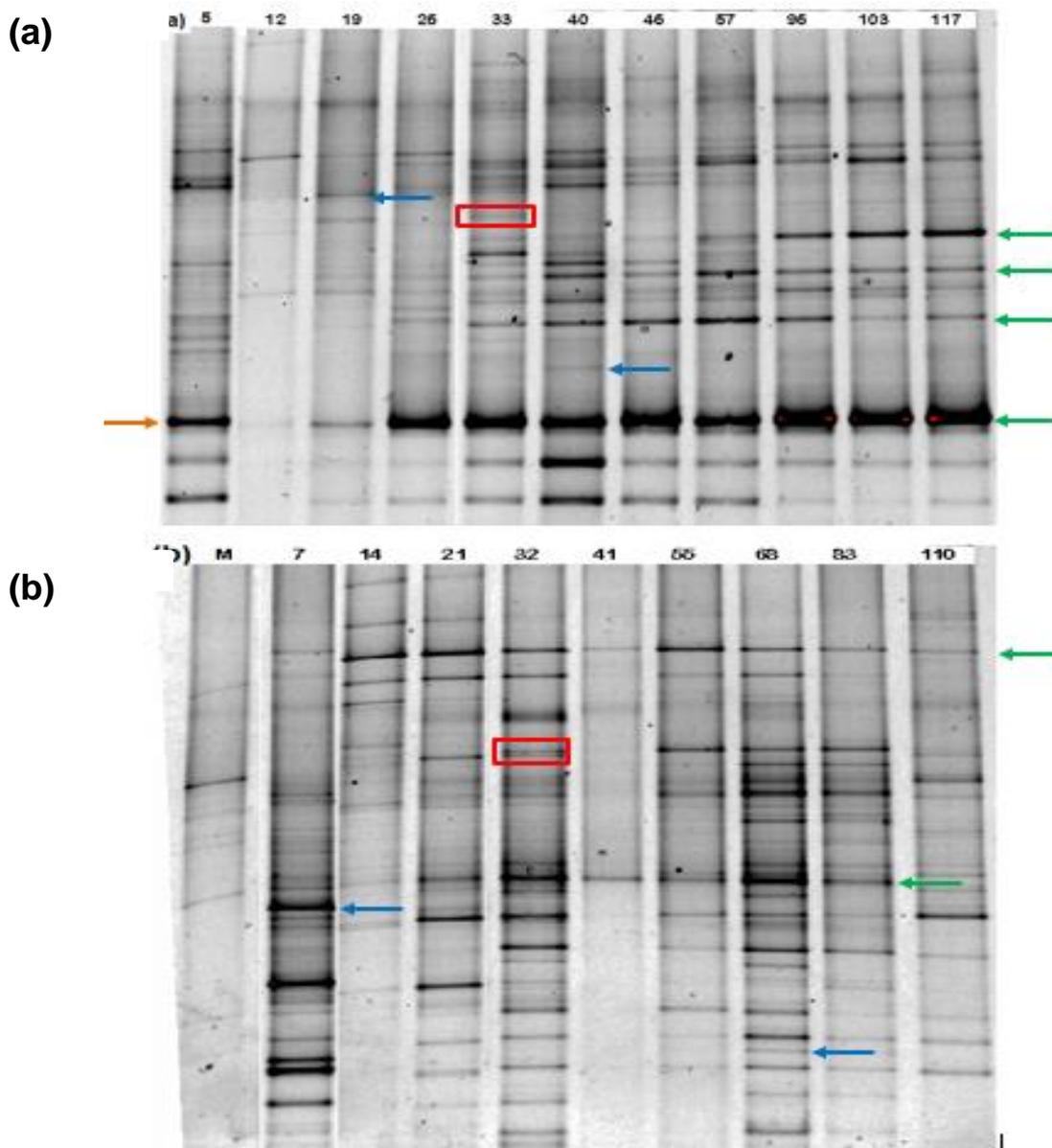
Los parámetros para un adecuado DGGE se establecieron previamente por personal y estudiantes del laboratorio de biología molecular de la Universidad de Cuenca (FCCAA). Como se observa en la Figura 9 (a) y (b), la definición de las bandas es clara, todas las muestras contenían ADN y se observan patrones con bandas de diferentes intensidades, esto se logró con un gradiente desnaturalizante entre 35% y 55%, evitando así la acumulación de bandas en la parte central del gel.

Cada uno de los patrones (carriles) obtenidos en el DGGE representa a la población de bacterias de una determinada muestra de compost, del mismo montón, pero de diferente día de compostaje, y de cada una de las plantas productoras estudiadas.

Cada banda representa un grupo bacteriano diferente, y la intensidad de cada banda representaría la cantidad de microorganismos de una determinada especie, debido a que se trabajó con cantidades iguales de ADN provenientes del producto de PCR. En los patrones de bandas correspondientes a la planta de la Emac **(A)** [Figura 9 (a)] se observa que la concentración de ADN cargado para cada carril es similar, a excepción de la muestra del día 12 donde se dificultó la identificación de las bandas. Una observación importante en la Figura 9 (a) es que en la línea de bandas con la señal naranja, a medida que avanza la edad del compostaje esta banda se va definiendo más y más, lo que supondría que esta población incrementa desde el inicio hasta el final del proceso, este comportamiento se pudo observar en otras líneas de bandas pero no tan clara como la marcada; este tipo de comportamientos no se distinguieron fácilmente en los patrones de bandas de la planta de la Italiana **(B)** [Figura 9 (b)]; por otro lado en la Figura 9 (b) en la muestra del día 41 y el Marcador (M) se observa que la cantidad de ADN cargada son inferiores al resto de muestras, esto se podría deber a que la purificación no resultó muy exitosa para estas muestras y/o los inhibidores dificultaron una correcta amplificación generando falsos positivos al momento de la cuantificación, o se perdió una alta cantidad de ADN al momento de la purificación (Howeler *et al.* 2003).

Durante el análisis de las bandas de cada línea correspondiente a una muestra en específico se observó la presencia de bandas dobles, que pueden ser mutaciones aleatorias conocidas como heteroduplex, como las marcadas en la Figura 9 (a) y (b) con

recuadro rojo. Existen bandas que se repiten en algunas muestras como las marcadas en las Figuras 9 (a) y (b) con las señales de color verde, lo que indicaría que ciertas muestras comparten ciertos grupos bacterianos; así mismo existen bandas que están presentes en una o en pocas muestras como las marcadas con la señal de color azul, lo que indicaría que son grupos bacterianos únicos de una respectiva muestra.



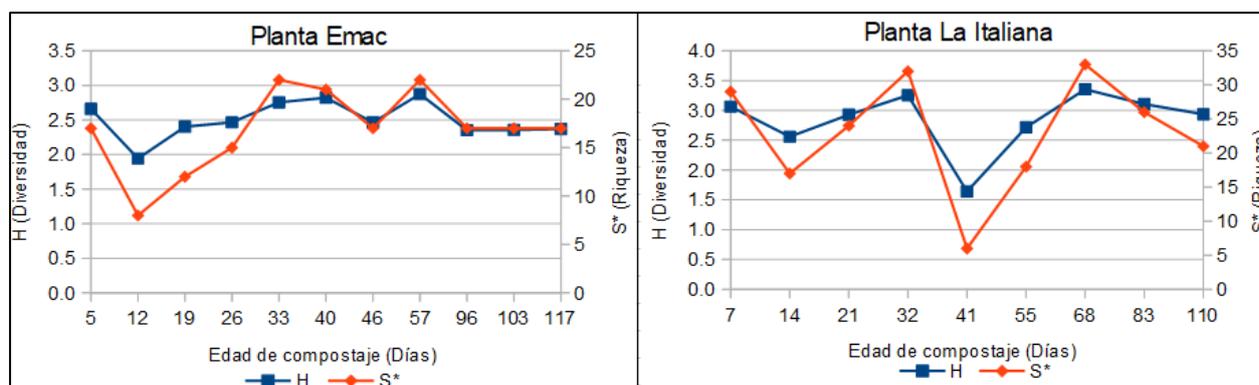
**Figura 9.** Perfil de DGGE con rango desnaturalizante de 35% a 55% para el ARNr 16S en comunidades bacterianas de dos plantas productoras de compost, de diferente edad de compostaje: **(a)** Planta de compostaje de la Emac, **(b)** Planta de compostaje de La Italiana, Línea M marcador correspondiente a la muestra 1067 (día 12) de la planta de compost **A**.

#### 5.4. Análisis de la riqueza, estructura y diversidad bacteriana

Los índices de riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas que se encuentran colonizando a lo largo del proceso de compostaje para cada una de las plantas **A** y **B** se

muestran en la Tabla 5. De igual manera se observa la dinámica de la riqueza y diversidad bacteriana a lo largo del proceso de compostaje en la Figura 10.

Para poder determinar diferencias entre los índices de diversidad y riqueza de acuerdo al sustrato utilizado por cada una de las plantas de compostaje (Planta **A**: Desechos orgánicos, Planta **B**: Estiércol de cerdo), se plantearon dos hipótesis: a)  $H_0$ : No existen diferencias en la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas entre las plantas de compostaje estudiadas, y  $H_a$ : Existen diferencias en la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas entre las plantas de compostaje estudiadas.



**Figura 10:** Dinámica de la riqueza y diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje de dos plantas **A** y **B** productoras; Índice de Shannon Weaver (**H**), Índice de Riqueza de especies (**S\***)

**Tabla 5:** Valores del Índice de Diversidad e índice de Riqueza de las comunidades bacterianas de las muestras de compost para cada una de las plantas de compostaje Emac e Italiana, calculados a partir de los perfiles generados a través de la técnica de DGGE.

	Código Muestra	Edad de Compostaje (días)	Temperatura Interna (°C)	H	S *
Planta de compost Emac: Desechos Municipales	1070	5	80	2.66	17
	1067	12	54.5	1.94	8
	1068	19	60	2.40	12
	1069	26	63	2.47	15
	1071	33	63	2.75	22
	1072	40	61	2.82	21
	1073	46	63	2.46	17
	1074	57	61	2.87	22
	1075	96	44	2.35	17
	1076	103	50	2.36	17
	1077	117	40	2.37	17
$\bar{X} \pm DE$				$2.5 \pm 0.27$	$17 \pm 4.19$
Planta de compost La Italiana: Estiércol de cerdo	1080	7	57.6	3.06	29
	1078	14	54.5	2.56	17
	1079	21	62.8	2.93	24
	1081	32	57.5	3.25	32
	1082	41	55.9	1.64	6
	1083	55	54.3	2.72	18
	1084	68	49.1	3.35	33
	1085	83	46.5	3.11	26
	1086	110	37.5	2.94	21
	$\bar{X} \pm DE$				$2.84 \pm 0.51$

Índice de Shannon Weaver (**H**), Índice de Riqueza de especies (**S\***), Media ( $\bar{x}$ ), Desviación estándar (**DE**).



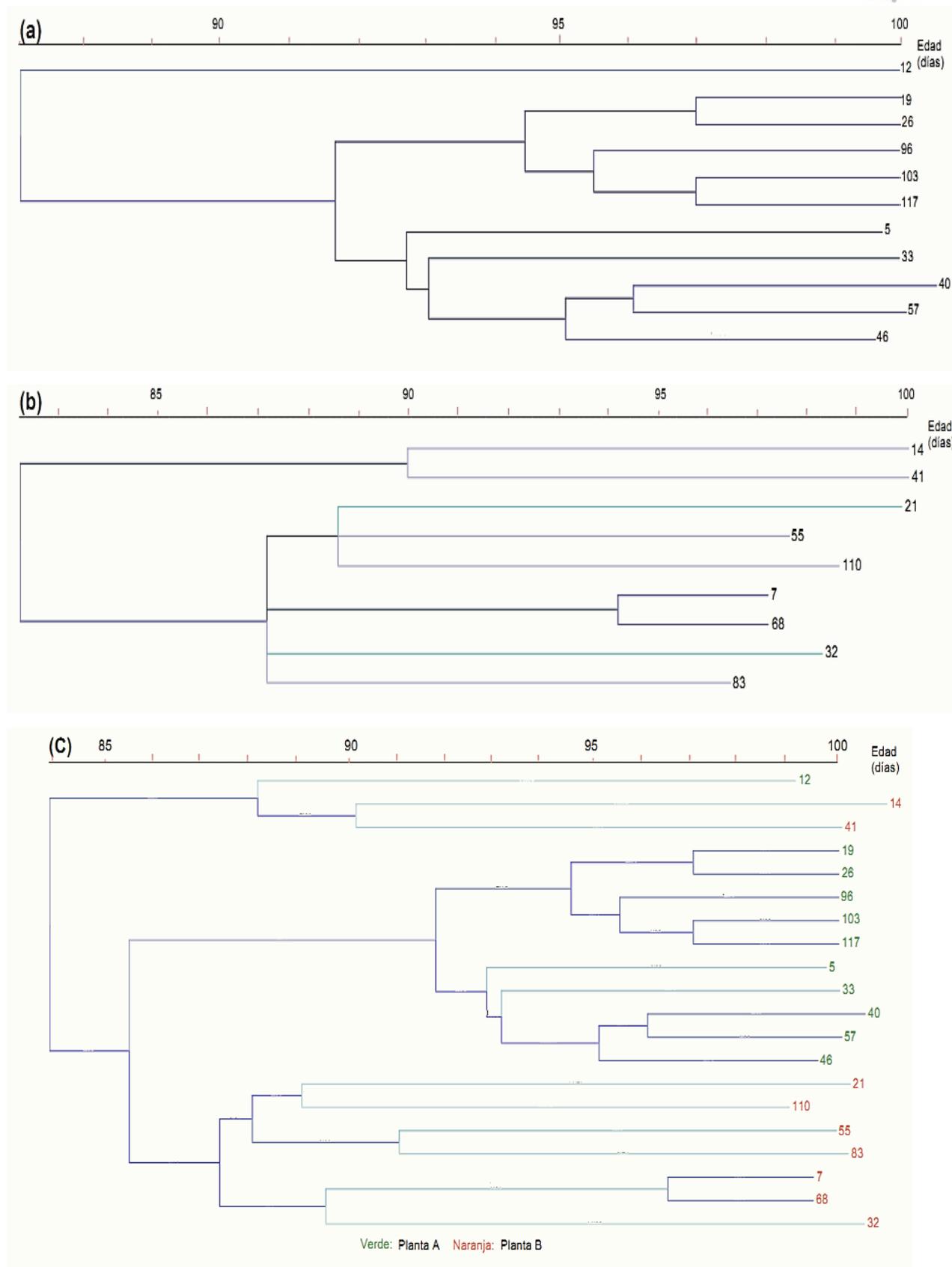
La tabla 6 muestra las medias entre ambas plantas a lo largo del proceso, obteniendo que en la Planta **B**, cuyo sustrato es de Estiércol de cerdo, mostró mayor diversidad a lo largo del proceso de compostaje (H: 2.84), igualmente para la media de la riqueza se observan mayor número de UTOs en la Planta **B** (S: 23); en el análisis estadístico para diversidad bacteriana mostró que no existen diferencias significativas entre ambas plantas  $t(20)=-1.92, p=0.07$ ). Este resultado sugiere que la diversidad bacteriana en planta **A** (M=2.5; DE=0.27) y la planta **B** (M=2.84; DE= 0.51) presentan valores similares, por lo tanto no hay argumentos suficientes para rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ).

**Tabla 6:** Prueba de *t de student* ( $p<0.05$ ) para las variables de diversidad y riqueza bacteriana del composta, con respecto al sustrato de cada una de las plantas estudiadas.

Prueba de muestras independientes					
	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
H	1.690	<b>.210</b>	-1.927	18	<b><u>.070</u></b>
S*	4.471	<b>.049</b>	-1.953	11.131	<b><u>.076</u></b>

Índice de diversidad de Shannon-Weaver (**H**) e índice de Riqueza de especies (**S\***).

En cuanto a la estructura de las comunidades microbianas derivada de los perfiles de DGGE (Figura 11), se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico para poder diferenciar entre poblaciones de la planta **A** y la planta **B**, donde se observó agrupamientos consistentes de acuerdo a cada una de las plantas de compostaje, es decir de acuerdo al sustrato. En el análisis jerárquico (a) se observó que existe cierto agrupamiento entre las muestras del inicio del proceso con las del final de acuerdo a la edad de la composta (días), por lo tanto se dice que estas muestras comparten poblaciones bacterianas similares, y las muestras que se tomaron al intermedio del proceso presentaron otro agrupamiento de similitud entre ellas, a excepción de la muestra del día 5 que correspondería a la muestra inicial. Por otro lado en el análisis jerárquico (b) no se observó un agrupamiento entre muestras de cada una de las fases, no presentaron mayor similitud, esta situación pudo influir en que la planta **B** presentara una media de diversidad mayor a la planta **A**. En el agrupamiento en conjunto (c) de la planta **A** con la **B**, se observa que las únicas muestras que presentan cierta similitud entre plantas son la del día 12 de la planta **A**, con las del días 14 y 41 de la planta **B**.



**Figura 11:** Análisis de agrupamiento jerárquico UPGMA a partir de los perfiles de DGGE de fragmentos amplificados para la región 16S ARNr de bacterias a partir de ADN metagenómico en muestras de compost a partir de la edad del compostaje en días: **(a)** Agrupamiento de muestras de la planta **A**, **(b)** Agrupamiento de muestras de la planta **B** y **(c)** Agrupamiento de muestras de las planta **A** con la planta **B** en conjunto.

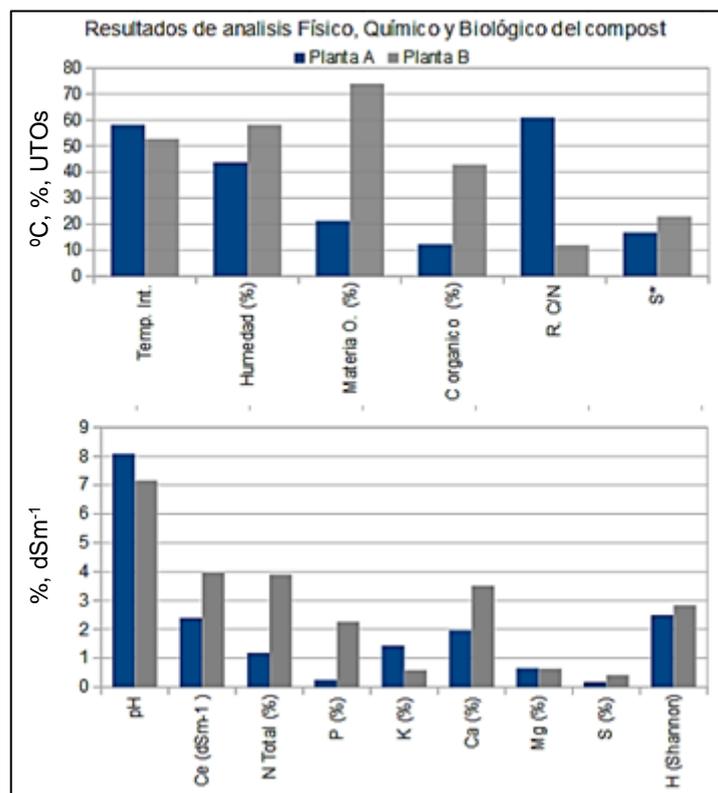


Al analizar la diversidad bacteriana por cada una de las fases diferenciadas se obtuvo que para la planta **A**, la mayor diversidad se encuentra en la fase termófila ( $M= 2.55 \pm 0.3$ ), seguida de la fase mesófila II ( $M=2.53 \pm 0.3$ ) y de la fase de enfriamiento ( $M=2.36 \pm 0.01$ ); por otro lado para la planta **B**, el comportamiento es contrario al de la planta **A**, la mayor diversidad se encuentra en la fase mesofílica II ( $M=3.06 \pm 0.3$ ), seguido por la fase de enfriamiento ( $M=3.02 \pm 0.1$ ) y finalmente la fase termófila ( $M=2.69 \pm 0.6$ ).

### 5.5. Características físicas y químicas del proceso de compostaje.

De acuerdo a lo planteado en el proyecto, se presentan las características físico-químicas de cada una de las muestras de composta de las dos plantas bajo estudio (Anexo 8).

Para poder determinar diferencias entre las características físico-químicas de las muestras de composta de acuerdo al sustrato utilizado por cada una de las plantas (Planta Emac **(A)**: Desechos orgánicos, Planta la Italiana **(B)**: Estiércol de cerdo), nos planteamos dos hipótesis: a)  $H_0$ : No existen diferencias en las características físicas y químicas entre las plantas de compostaje estudiadas, y  $H_a$ : Existen diferencias en las características físicas y químicas entre las plantas de compostaje estudiadas. Aquellas variables que no presentaban una distribución normal de sus datos fueron transformados para proceder con el análisis paramétrico, entre las variables transformadas están: humedad, M.O., C Org., R. C/N, P, K, Ca, Mg y S. Los resultados comparativos para cada una de las variables expresados en promedios de todo el proceso de compostaje de las dos plantas bajo estudios se presentan en la figura 12.



**Figura 12:** Promedios de los resultados de las variables Físicas, Químicas y Biológicas de las dos plantas de compostaje bajo estudio. Índice de Shannon Weaver (**H**), Índice de Riqueza de especies (**S\***)

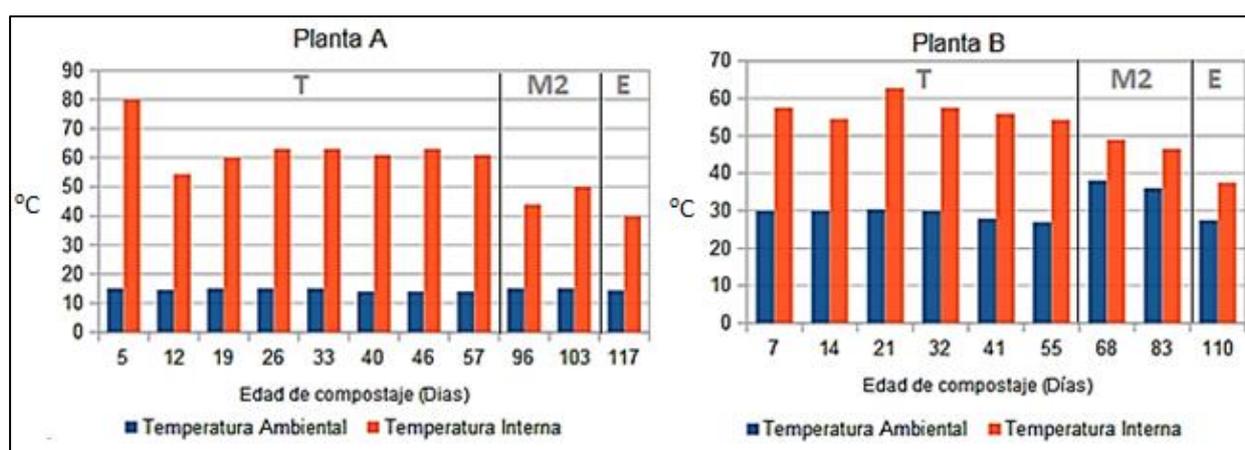
**Tabla 7:** Propiedades Físico-químicas de las muestras de compost por fases.

Propiedades	Planta A			Planta B		
	Termófila	Mesófila 2	Enfriamiento	Termófila	Mesófila 2	Enfriamiento
<b>pH</b>	8.2 ± 0.4	8.2 ± 0.4	7.7 ± 0.6	7.1 ± 0.2	7.5 ± 0.3	7.4 ± 0.5
<b>Ce (dSm-1)</b>	2.2 ± 0.4	2.8 ± 0.4	3.2 ± 0.1	4.3 ± 1	3.9 ± 1.3	3.1 ± 0.7
<b>Humedad (%)</b>	50.5 ± 3.1	32.9 ± 8.9	27.7 ± 2.7	60.3 ± 5	56.3 ± 3.5	52.6 ± 0.3
<b>M.O. (%)</b>	21.9 ± 2.9	19.5 ± 0.4	19.7 ± 0.4	79.8 ± 4.9	70.1 ± 8.8	61.4 ± 5.2
<b>Carbón O (%)</b>	12.9 ± 1.7	11.3 ± 0.2	11.4 ± 0.2	46.3 ± 2.8	40.7 ± 5.1	35.6 ± 3
<b>Nitrógeno T. (%)</b>	1.4 ± 1	1.3 ± 1.1	0.1	3.8 ± 0.9	3.9 ± 1.3	4.5 ± 2.5
<b>R. C/N</b>	42.2 ± 55.6	59.1 ± 92.3	163.4 ± 3.3	13 ± 3.4	11.1 ± 2.5	9.5 ± 6
<b>P (%)</b>	0.2	0.2	0.3 ± 0.2	1.7 ± 0.8	2.2 ± 1.6	3.8 ± 0.7
<b>K (%)</b>	1.4 ± 0.1	1.6	1.5	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.9 ± 0.1
<b>Ca (%)</b>	1.4 ± 0.1	2.0	2.1	2.6 ± 1.2	3.2 ± 2.6	6.0 ± 1
<b>Mg (%)</b>	0.6	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.5	1.0 ± 0.1
<b>S (%)</b>	0.2	0.2	0.2	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1

Materia Orgánica (**M.O.**), Conductividad eléctrica (**Ce**).

El comportamiento de las temperaturas internas durante el compostaje de las dos plantas, se presenta en la figura 13. El compost en la planta **A** alcanzó rápidamente la fase termófila, al cabo de apenas 5 días desde el ingreso de los desechos, la composta

llegó a temperaturas de hasta 80 °C. A partir de ahí la temperatura empezó a descender, pero se mantuvo cercana a los 60 °C durante los 50 días posteriores; a partir del día 96 la temperatura empezó a descender hasta llegar a los 40 °C. De forma similar, en la planta **B** la temperatura del sustrato incrementa rápidamente; en el día 7 se alcanzó una temperatura de 57.6 °C, pero la máxima T (62.8 °C) se obtuvo el día 21. A partir de ese punto la temperatura empezó a disminuir paulatinamente, hasta alcanzar los 37.5 °C en el día 110 (Figura 13). De esta manera se pudo definir 3 de las 4 fases durante el proceso de compostaje de acuerdo a los intervalos de temperatura; la termófila (**T**) (50-80 °C), la mesófila II (**M2**) (40-50 °C), la de maduración o enfriamiento (**E**) ( $\leq 40$  °C) (Figura 13).



**Figura 13:** Dinámica de las temperaturas, ambiental e interna del compost a lo largo del proceso de compostaje **A** y **B**.

**Tabla 8:** Características de la temperatura durante el compostaje

Perfil de Temperatura	Resultados Planta A (Emac)	Resultados Planta B (La Italiana)
Temperatura inicial (°C)	39	38
Temperatura Pico (°C)	80	62.8
Tiempo en alcanzar temp. Pico (días)	5	21
Rango de temperatura para fase termófila (°C)	54.5 - 80	54.3 - 62.8
Duración fase termófila (Días)	55	52
Temperatura final (°C)	40	37.5
Duración del compostaje (Días)	117	110



En las dos plantas de compostaje evaluadas se pudo diferenciar las 4 fases y sus duraciones de acuerdo a los rangos de temperatura obtenidos: para la planta **A**, la fase **M1** fue del día 1 al 2, la fase **T** fue del día 2 al 57, durante esta fase; el proceso se vio interrumpido por el volteo del material cada día, para la fase **M2** fue del día 57 al 103 y para la fase **E** del día 103 al 117. Para la planta **B**, la fase **M1** duraba del día 1 al 3, la fase **T** fue del día 3 al 55, esta fase tuvo un único volteo; la fase **M2** fue del día 55 al 83 y para la fase **E** del día 83 a 110.

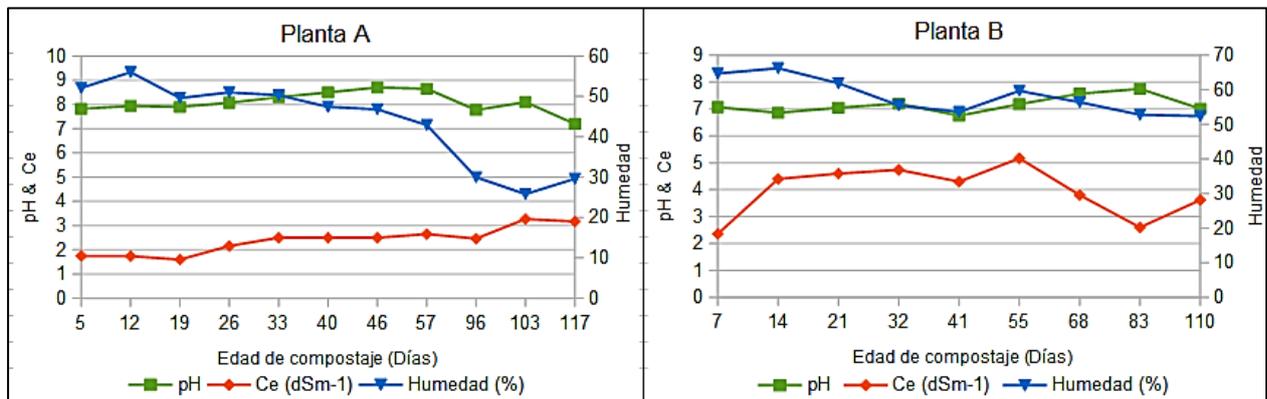
En orden a examinar diferencias en la temperatura interna de las muestras de composta entre la planta **A** ( $M=58.13$ ;  $DE=10.85$ ) y **B** ( $M=52.85$ ;  $DE=7.47$ ), se llevó a cabo una prueba de  $t$  para muestras independientes; en el test de Levene se obtuvo que existe homogeneidad de varianzas  $F=0.78$ ,  $p>0.05$ , por lo tanto se asume varianzas iguales. Los resultados de la prueba de  $t$  indicaron que no existen diferencias significativas en el comportamiento de la temperatura interna entre la planta **A** y la planta **B**  $t(20)=1.24$ ,  $p>0.05$ ; por lo tanto el comportamiento de la temperatura interna es ajeno al sustrato utilizado.

En cuanto a las condiciones químicas, el pH de la planta **A** se mantuvo por valores cercanos al neutro y básico ( $M=8.08$ ;  $DE=0.43$ ) se observa un leve aumento desde el día 33 al 57 (8.3 a 8.65). Para la planta **B** el pH se mantuvo por valores cercanos al neutro ( $M=7.16$ ;  $DE=0.32$ ). Igualmente se realizó una prueba de  $t$  asumiendo varianzas iguales ( $F=0.772$ ;  $p>0.05$ ), donde se obtuvo que existía diferencias significativas entre el pH de las plantas de compostaje,  $t(20)=5.28$ ,  $p<0.01$ ; la variable pH puede llegar a depender hasta cierto punto del sustrato utilizado para el compostaje.

Para la conductividad eléctrica se obtiene que en la planta **A** empezó con una conductividad de  $1.75 \text{ dSm}^{-1}$  y aumentó gradualmente hasta  $3.17 \text{ dSm}^{-1}$  al final del proceso, mientras tanto en la planta **B** empezó con  $2.36 \text{ dSm}^{-1}$  y aumentó rápidamente durante la fase termófila hasta  $5.17 \text{ dSm}^{-1}$  del día 55 y a partir de ahí empieza a disminuir hasta  $3.62 \text{ dSm}^{-1}$  del día 110 (Figura 14). En la prueba de  $t$  (asumiendo varianzas iguales  $F=3.34$ ,  $p>0.05$ ), igualmente se obtuvo que existen diferencias significativas en el comportamiento de la conductividad eléctrica entre las dos plantas  $t(20)=-4.59$ ,  $p<0.01$ .

En cuanto al contenido de humedad para la planta **A** ( $M=43.77$ ,  $DE=10.42$ ) empezó con  $52.1 \%$  al inicio del proceso y fue disminuyendo gradualmente hasta  $29.6 \%$  al final del proceso; mientras que en la planta **B** ( $M=58.13$ ,  $DE=5.21$ ) la humedad empezó con un

64.7 % y disminuyó gradualmente hasta 52.4 % (Figura 14). Cabe mencionar que la pila de compost de la segunda planta presentaba cobertura de lona a diferencia de la primera que se encontraba a cielo abierto. Los resultados de la prueba de  $t$  (asumiendo varianzas iguales  $F=0.11$ ,  $p>0.05$ ) nos muestra que existen diferencias significativas entre el comportamiento de la humedad a lo largo del proceso de compostaje para las dos plantas  $t(19)=-4.7$ ,  $p<0.01$ .

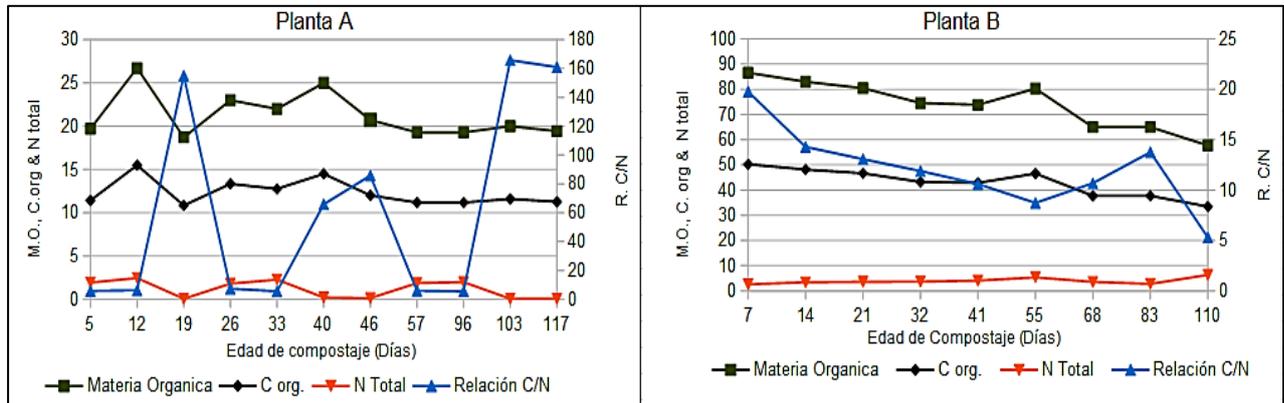


**Figura 14.** Dinámica de las características físicas y químicas de las muestras de compost de la planta **A** y **B**; pH, Conductividad eléctrica (Ce dSm-1) & humedad (%).

En cuanto al porcentaje de M.O. para la planta **A** ( $M=21.26$ ,  $DE=2.63$ ) se mantuvo dentro de un rango desde 18.71 % hasta un máximo de 25 %, mientras que para la planta **B** ( $M=74.04$ ,  $DE=9.67$ ) los valores fueron 86.57 % al inicio del proceso y 57.71 % al final del proceso. En la prueba de  $t$  (asumiendo varianzas iguales  $F=0.33$ ,  $p>0.05$ ), se obtuvo que existen diferencias significativas en el porcentaje de M.O. entre las dos plantas  $t(19)=-5.92$ ,  $p<0.01$ .

En cuanto a la R.C/N, en la planta **A** ( $M=60.92$ ,  $DE=69.65$ ) se observó fuertes variaciones a lo largo del proceso, se obtuvo valores entre 5.62 y 165.71, esto se puede deber a que al momento de realizar las mediciones de N no se retiraron posibles pedazos de aserrín y pequeños trozos de madera que pudieron causar diferencias en las mediciones, ya que la lignina no se degrada durante el compostaje (Iiyama *et al.* 1994), igualmente la heterogeneidad y la naturaleza de los materiales de la planta **A** pueden causar este tipo de variaciones, al no conocer exactamente el contenido de N de cada uno de estos. Para la planta **B** ( $M=11.96$ ,  $DE=3.76$ ) los valores fueron más estables, debido a la homogeneidad del sustrato. En la prueba de U Mann-Whitney (no paramétrica) se obtuvo que no existieron diferencias significativas en los valores de R.C/N entre las dos

plantas  $U=48$ ,  $p>0.05$ , esto se debe a que la prueba estadística se hizo a partir de las medianas, ya que las medias no se ajustaban al análisis paramétrico debido a la variabilidad de los datos de la planta **A** (Figura 15).



**Figura 15:** Características químicas de las muestras de compost de la planta **A** y **B**; Materia Orgánica (M.O.%), Carbono orgánico (C. Org. %), Nitrógeno total (N total %) y relación Carbono-Nitrógeno (R. C/N)

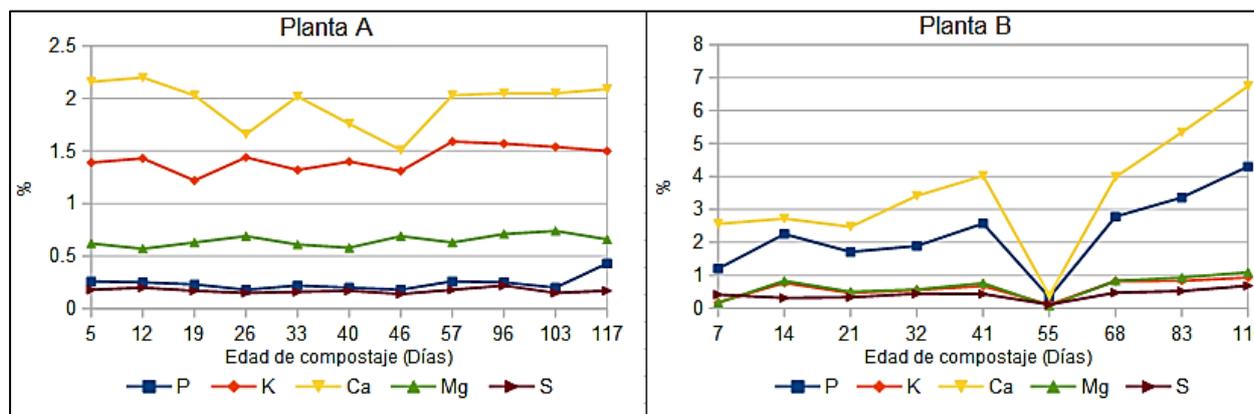
En cuanto al análisis de contenido de elementos químicos en la planta **A** (Figura 15) el contenido de N total ( $M=1.17$ ,  $DE=1.03$ ) no presentó un comportamiento homogéneo, Se determinaron valores muy bajos de 0.07 % y en otros valores altos como 2.46 %, mientras que para la planta **B** ( $M=3.9$ ,  $DE=1.21$ ) tuvo un comportamiento más uniforme. En la prueba de  $t$  (asumiendo varianzas iguales  $F=0.10$ ,  $p>0.05$ ), se obtuvo que existen diferencias significativas en el contenido total de N entre las dos plantas  $t(20)=-5.42$ ,  $p<0.01$ . Demostrando que el contenido de N total está en relación con el tipo de sustrato usado en el compostaje.

Durante el análisis se observó un comportamiento diferente para una de las muestras de la planta **B** en cuanto a los análisis químicos, en el día 55 cuando el contenido de N t. aumenta, el contenido del resto de nutrientes desciende proporcionalmente, tal como se observa en la figura 15 y 16, asumiendo una correlación negativa entre el N y el resto de elementos.

En cuanto a C org., en la planta **A** ( $M=12.33$ ,  $DE=1.53$ ) presentó valores relativamente bajos, en comparación con los valores de la planta **B** ( $M=42.94$ ,  $DE=5.6$ ); En la prueba de  $t$  (asumiendo varianzas iguales  $F=0.33$ ,  $p>0.05$ ), se obtuvo que existen diferencias significativas en el contenido de C org. entre las dos plantas  $t(19)=-5.93$ ,  $p<0.01$ ; demostrándonos que el contenido de C org. está en relación con el tipo de sustrato usado en el compostaje.



Para el resto de elementos presentaron comportamientos diferentes para cada elemento de cada una de las plantas estudiadas, así mismo se realizó una prueba de *t* para muestras independientes, obteniendo diferencias significativas para la mayoría de elementos analizados a excepción del Mg donde se comporta de forma similar en ambas plantas (Tabla 9). Por lo tanto el contenido de P, K, Ca y S se relacionan con el tipo de sustrato usado en cada una de las plantas, mientras que el Mg no se relaciona (Figura 16).



**Figura 16.** Comportamiento de los elementos químicos (P, K, Ca, Mg, S disponibles) durante el proceso de compostaje para cada una de las plantas **A** y **B**, a partir del análisis químico de sus muestras.

**Tabla 9:** Resultados de la prueba de *t de student* ( $p < 0.05$ ) para los elementos químicos del compost, con respecto al tipo de sustrato usado en cada una de las plantas.

	Planta EMAC (A)		Planta ITALIANA (B)		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias		
	M	DE	M	DE.	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
<b>P</b>	0.24	0.07	2.26	1.17	.245	.627	-5.659	17	.000
<b>K</b>	1.42	0.12	0.59	0.29	.025	.876	6.038	17	.000
<b>Ca</b>	1.96	0.22	3.51	1.82	.990	.334	-2.979	17	.008
<b>Mg</b>	0.65	0.05	0.63	0.34	40.583	.000	-.033	8.200	.974
<b>S</b>	0.17	0.23	0.41	0.16	1.061	.317	-2.984	17	.008

M: media, DE: desviación estándar.

Por lo tanto se dice que para las variables de temperatura interna, R.C/N y contenido de Mg no existen argumentos suficientes para rechazar la  $H_0$ , y para las variables de pH, Ce, Humedad, M.O., N t, C org., P, K, Ca y S se concluye que estas variables pueden



estar en función del sustrato utilizado en cada una de las plantas, tanto para la planta **A**, como para **B** debido a las diferencias significativas encontradas.

### **5.6. Correlación entre los índices de riqueza y de diversidad de las comunidades microbianas frente a las características físico-químicas de la composta.**

Se realizó un análisis de correlación paramétrico para observar las variables que están más relacionadas entre los índices de diversidad y riqueza de las UTOs con cada una de las características físico-químicas de la composta. Para esto se planteó dos hipótesis: a)  $H_0$ : No existe relación entre las características físico-químicas frente a los índices de diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas de cada una de las plantas de compostaje estudiadas, y b)  $H_a$ : Existen relaciones entre las características físico-químicas frente a los índices de diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas de cada una de las plantas de compostaje estudiadas.

En el anexo 6 y 7 se observa los resultados del análisis de correlación entre la diversidad y riqueza de cada una de las plantas de compostaje con las características físico-químicas analizadas, se observó que para la planta **A** existen 2 correlaciones positivas moderadas, no significativas ( $p > 0.05$ ) entre la diversidad y la temperatura interna ( $R^2 = 0.23$ ) demostrando que el 23 % de la variabilidad de la diversidad bacteriana depende de la temperatura interna; de la misma manera para la variable pH ( $R^2 = 0.26$ ), el 26 % de la variabilidad de la diversidad bacteriana depende del pH.

Para la riqueza de la planta **A** se obtuvieron dos relaciones positivas moderadas y no significativas ( $p > 0.05$ ), una para la variable pH ( $R^2 = 0.18$ ) y otra para la variable Ce ( $R^2 = 0.30$ ), con esto podemos decir que la Ce (30%) y el pH (18%) intervienen en la variabilidad de la riqueza bacteriana; también se observó una correlación negativa con la variable humedad ( $R^2 = 0.21$ ) no significativa ( $p > 0.05$ ), se puede decir que la humedad puede intervenir hasta un 21 % en la variabilidad de la riqueza, de manera inversa.

Para la planta **B** se obtuvieron dos correlaciones positivas fuertes y significativas ( $p < 0.05$ ) entre el pH y la diversidad ( $R^2 = 0.48$ ), y entre el pH y la riqueza ( $R^2 = 0.44$ ); esto nos permite afirmar hasta cierto punto que en la planta **B**, la variabilidad de la diversidad (48 %) y la riqueza (44 %) depende en un alto grado del pH.



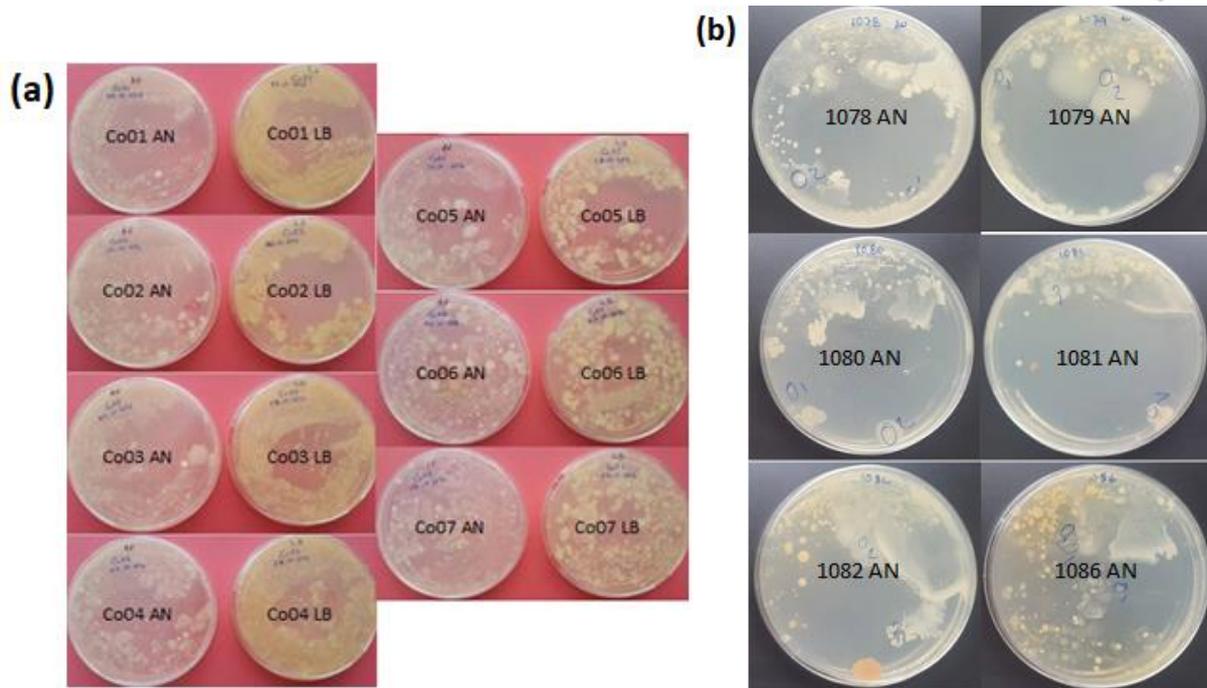
En cuanto a la variable de R.C/N se realizó un análisis no paramétrico, un test *Rho de Spearman* donde no se obtuvo ninguna correlación significativa ( $p > 0.05$ ) con la diversidad o la riqueza bacteriana, lo que representa que la variabilidad de la riqueza o la diversidad bacteriana no está en función de la R.C/N (Anexo 7)

De igual manera se realizó un análisis de correlación entre el resto de variables físicas y químicas, los resultados se pueden observar en el Anexo 6. En total se obtuvieron correlaciones a nivel significativo, entre estas, 12 correlaciones positivas muy fuertes y 4 correlaciones positivas fuertes; de igual manera se obtuvieron 10 correlaciones negativas muy fuertes y 3 correlaciones negativas fuertes.

El análisis de correlación entre el resto de variables físicas y químicas nos permitió encontrar relaciones indirectas de estas variables con la diversidad y riqueza bacteriana, para este caso la relación más significativa de la diversidad y riqueza fue con el pH, y el pH a su vez se relaciona negativamente y de manera significativa con la mayoría de variables, entre estas humedad, Ce, Nt, M.O., C org., P y Ca.

### 5.7. Cultivo de bacterias termófilas

Como se muestra en la Figura 17 (a) y (b) se obtuvo crecimiento en cada uno de los cultivos, estos se incubaron a 55 °C durante 24 y 48 h. A las 24 h la mayoría de las cajas mostraban crecimiento, la mayoría estaban cubiertas de crecimiento bacteriano, esto dificultó el aislamiento de colonias. De cada cultivo se intentó aislar y purificar 2 colonias. en total de la planta **(A)** se obtuvieron 22 aislados, y de la planta **(B)** se obtuvieron 24 aislados, tanto para medio LB como para medio AN, finalmente los aislados fueron almacenados a -80 °C en criobiales con 20 % de Glicerol (Anexo 9)

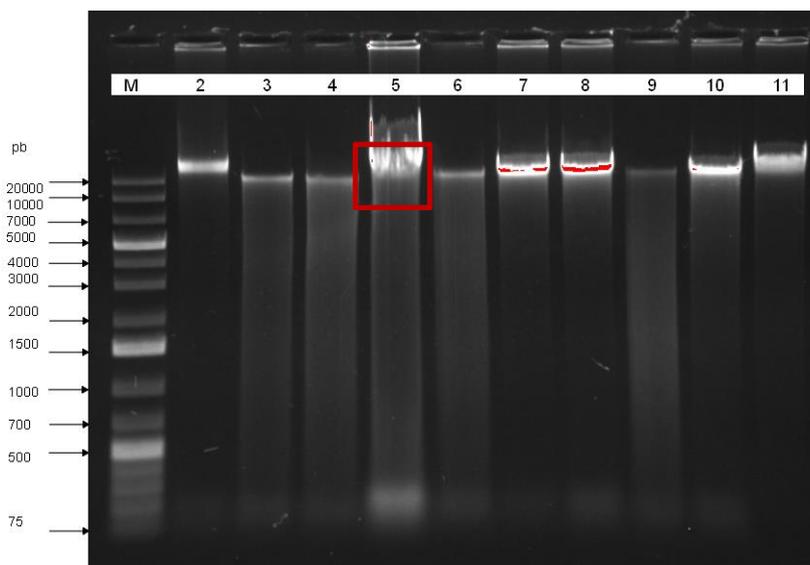


**Figura 17:** Cultivo de bacterias termófilas a partir de diluciones de muestras de composta en medio LB (Luria-Bertani) y medio AN (Agar nutritivo) incubadas durante 24 horas: **(a)** cultivos provenientes de muestras de composta de la planta **A**, **(b)** cultivos provenientes de muestras de composta de la planta **B**.

Como se observan en las Figura 17 (a) y (b) el crecimiento de las colonias es diferente entre las dos plantas de compostaje, lo que supondría que pertenecen a diferentes poblaciones de microorganismos.

### 5.8. Extracción de ADN de bacterias termófilas

Para la extracción del ADN de las bacterias termófilas usamos un método previamente descrito, que se fundamenta en el uso del detergente SDS y Proteinasa K, una enzima usada para degradar las proteínas de la membrana celular liberando el material genético y degradando las proteínas liberadas al medio. En la Figura 18 se muestra un gel de agarosa donde se visualiza la extracción de algunas muestras que se usaron de prueba para comprobar la extracción antes de someterlas a amplificación; la extracción fue exitosa con un tamaño superior a 2000 pb. La calidad del ADN extraído dependió de la cantidad de biomasa recolectada.

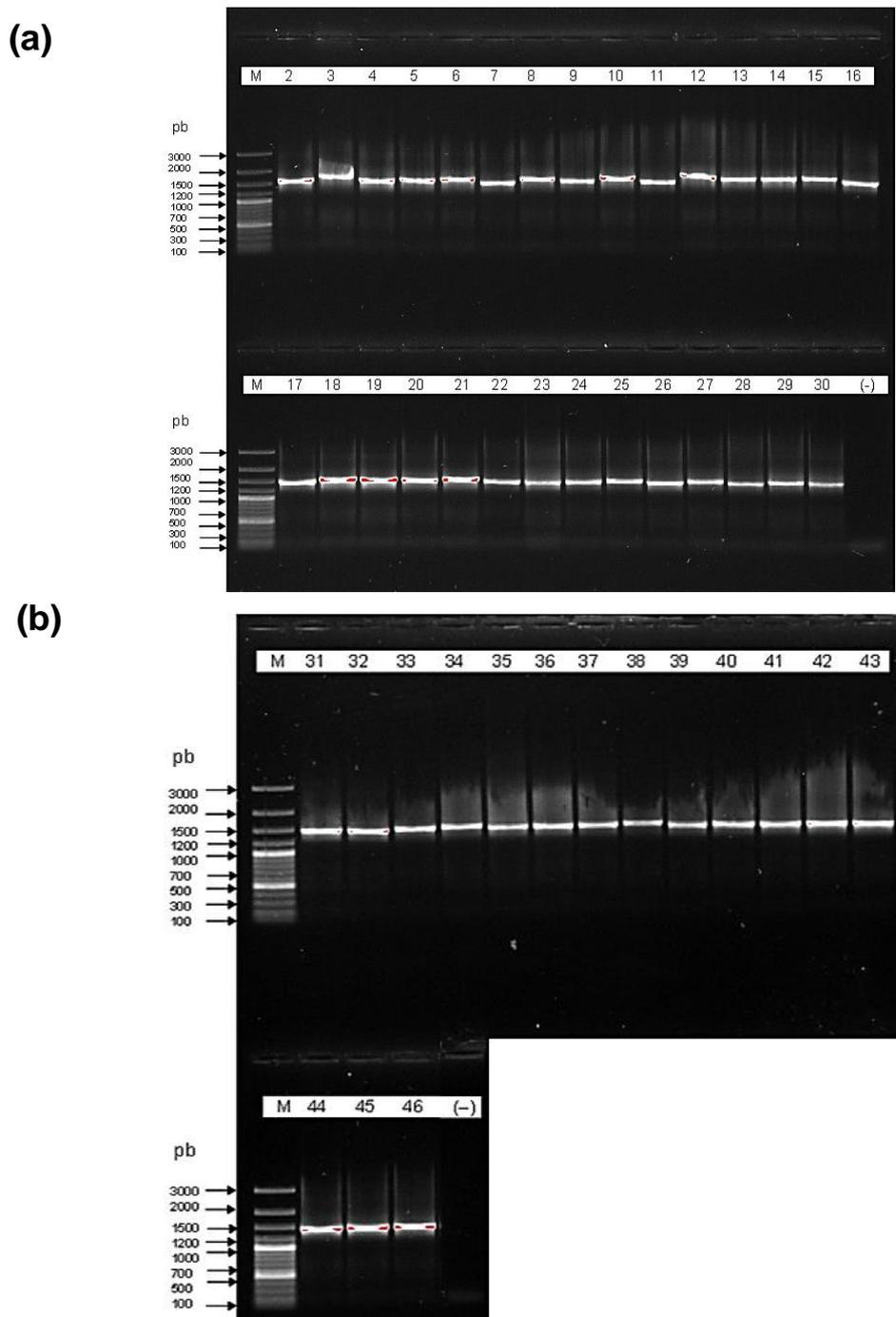


**Figura 18:** Extracción de ADN de prueba a partir de biomasa de bacterias termófilas. Línea M, Generuler™ 1 Kpb plus DNA Ladder (Fermentas).

Como se observa en la Figura 18 para el aislado 5 se observa que la banda no se encontró bien definida como el resto, se presume que el ADN no está bien disuelto y no le permite pasar adecuadamente a través del gel de Agarosa, sin embargo se sometió a PCR como el resto de muestras logrando un amplificación exitosa.

### 5.9. Amplificación del ADN bacteriano para la región 16S

Se observa en la Figura 19 (a) y (b) los resultados de la amplificación de la región 16S de cada una de las cepas purificadas con los cebadores 27 F y 1495 R. se observó en el gel de agarosa las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados (4  $\mu$ l de producto de cada muestra) y el marcador de peso molecular de 100 pb Plus nos muestra la longitud esperada de los fragmentos, de 1460 pb aproximadamente. Las figuras muestran que existió una buena amplificación en todas las muestras y no se observó la presencia de bandas dobles ni de contaminantes.



**Figura 19:** Amplificación por PCR normal del ARNr 16S con cebadores 27F y 1495R sometidas a electroforesis en gel de Agarosa al 1% p/v, bandas entre 1200 y 1500 pb aproximadamente: **(a)** aislados del 2 al 30, **(b)** aislados del 31 al 46. Línea M, Generuler™ 100 pb plus DNA Ladder (Fermentas).

Una vez verificada la amplificación, se purificó el producto de PCR a partir del gel mediante un método casero, previamente expuesto, para evitar inconvenientes al momento de la digestión con la enzima de restricción.

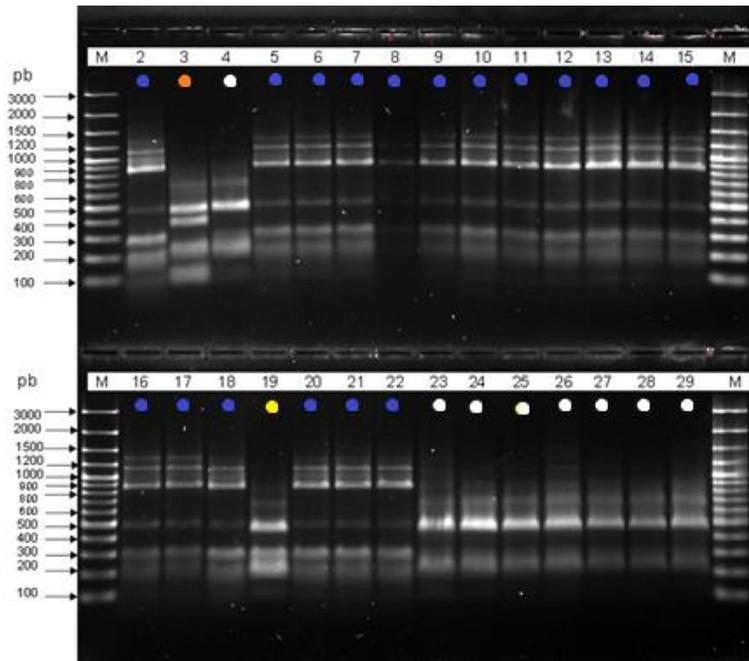


### 5.10. Identificación de las bacterias termófilas

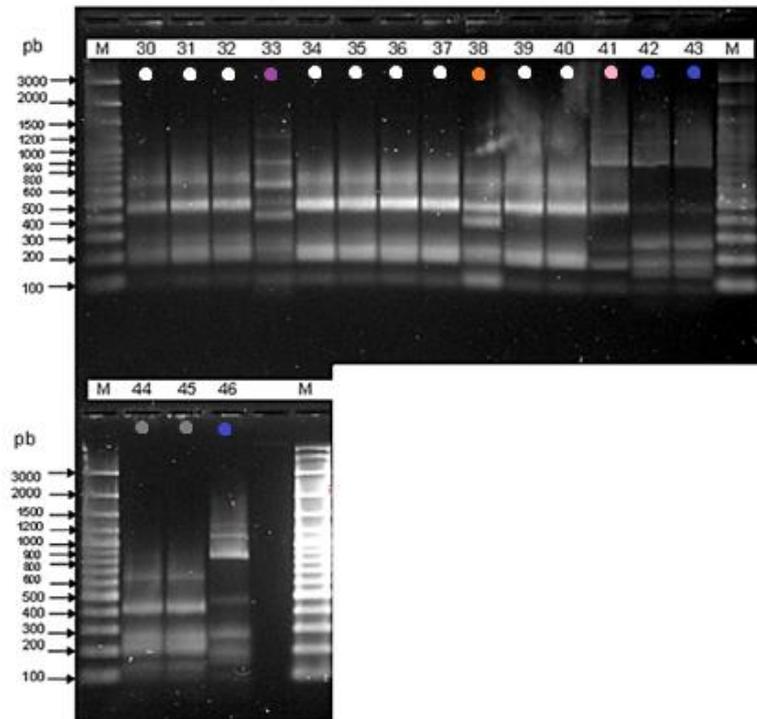
Una vez realizada la digestión con la enzima de restricción tipo *AluI*, se obtuvieron los diferentes patrones de restricción, tal como se observa en la Figura 20 (a) y (b), los patrones o perfiles de restricción de cada una de las cepas aisladas fueron comparadas con patrones previamente obtenidos con ayuda del software Serial Cloner 2.6.1. A partir de secuencias obtenidas del NCBI (National Center for Biotechnology Information) de bacterias termófilas.

Los patrones de restricción se repiten en ciertas muestras como se observa en la Figura 20 (a), entre las cepas aisladas a partir de las muestras de la planta **A** (2-22) se logran observar 4 patrones de restricción con diferencias marcadas [Figura 20 (a)]; los patrones de las líneas con la señal azul, que representaría el microorganismo más común aislado, y otros 3 patrones diferentes marcados con la señal naranja (línea 3), señal blanca (línea 4) y señal amarilla (línea 19). En el caso de las cepas aisladas a partir de las muestras de la planta **B** (23-46) [Figura 20 (a) y (b)] se observan 6 patrones de restricción diferentes, las líneas con la señal blanca, representan el microorganismo más común aislado en dicha planta, la líneas con las señales morada, naranja, y rosa (línea 33, 38 y 41 respectivamente) son patrones únicos en esta planta, y las líneas con la señales azules y grises son otros patrones encontrados en más de una sola línea. Entre las dos plantas comparten algunos patrones como los marcados con la señal azul, blanca y naranja.

(a)



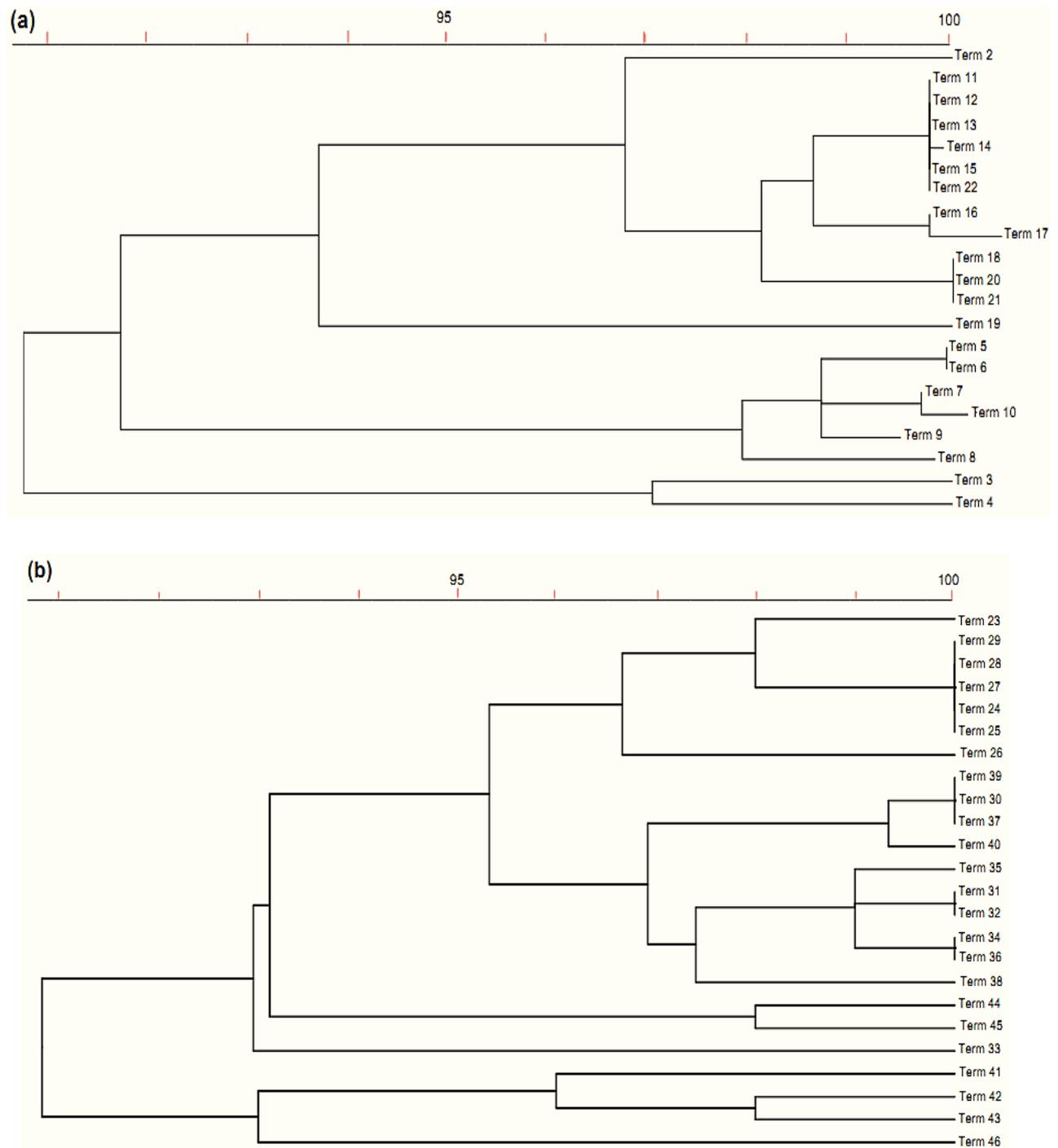
(b)

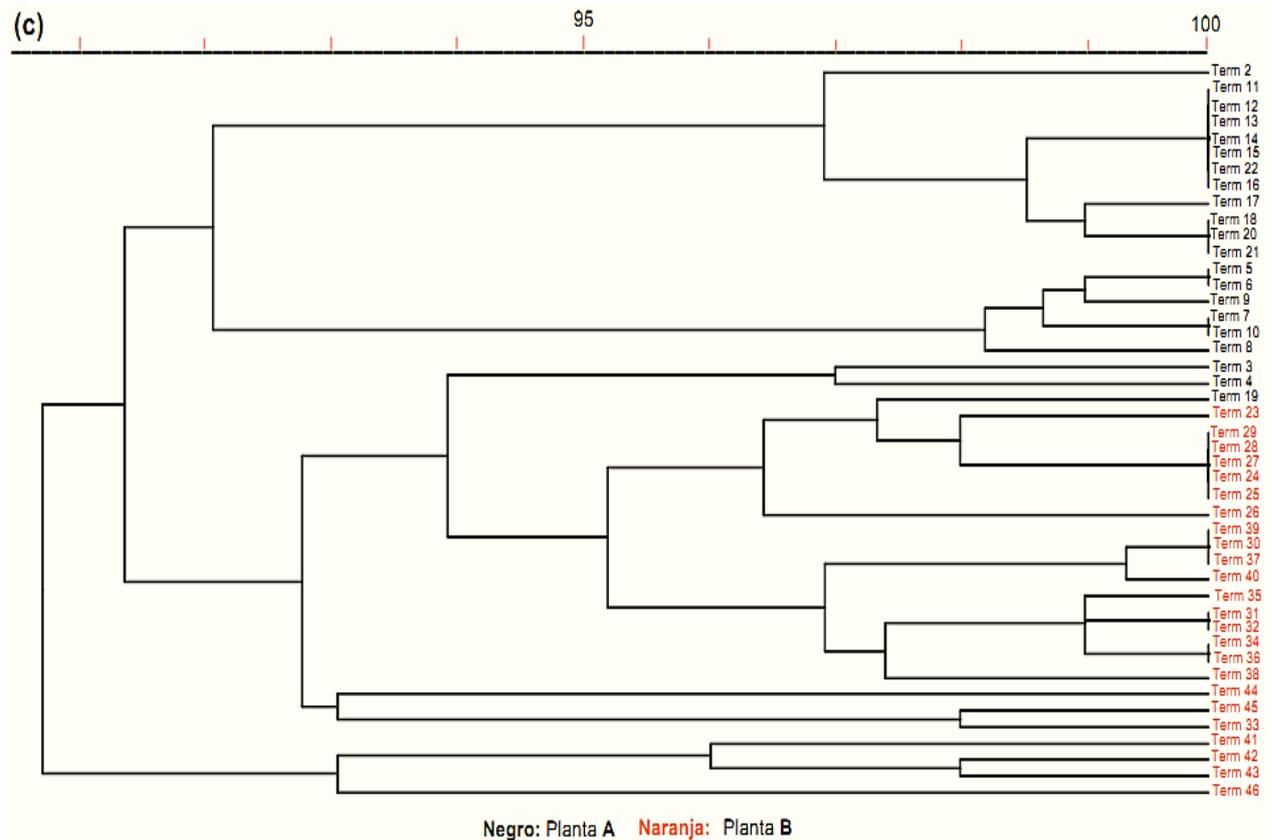


**Figura 20.** PCR-RFLP (*AluI*) perfiles de corte en gel de agarosa al 1.6%. Para PCR-RFLP se amplificó la región 16S ADNr con cebadores 27F/1495R. **(a)** Perfiles de corte para las cepas de la 2 a la 22, aislados provenientes de la planta **A** y perfiles de corte para las cepas 23 a la 29 provenientes de la planta **B**, **(b)** Perfiles de corte para las cepas de las 30 a la 46, aislados provenientes **B**. Línea M, Generuler™ 100 pb plus DNA Ladder (Fermentas).

Se realizó un análisis filogenético de los patrones de restricción obtenidos, bajo el método de agrupamiento jerárquico UPGMA, donde se pudo diferenciar entre patrones similares y diferentes de acuerdo a las distancias obtenidas en el árbol filogenético.

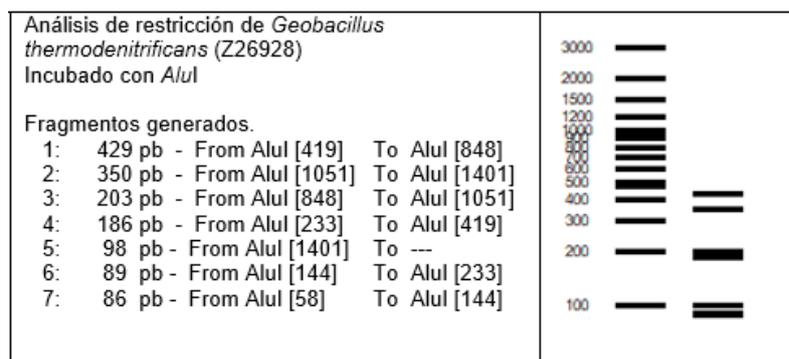
En la figura 21 se observaron ciertos agrupamientos entre organismos aislados de cada una de las plantas. Los agrupamientos nos permiten descartar organismos al momento de enviar a secuenciar, y seleccionar los que presentan diferencias claras en los patrones. En el agrupamiento de los microorganismos en conjunto [Figura 21 (c)] de las dos plantas se observaron que hay tres organismos de la planta **A** que comparten similitudes con ciertos microorganismos de la planta **B**.





**Figura 21:** Análisis de agrupamiento jerárquico UPGMA de patrones de PCR-RFLP de fragmentos amplificados de la región 16s ARNr de bacterias a partir de ADN de microorganismos termófilos aislados de las dos Plantas de Composta; **(a)** Agrupamiento de los microorganismos de la planta **A**, **(b)** Agrupamiento de los microorganismos de la planta **B** y **(c)** Agrupamiento de los microorganismos de las plantas **A** y **B** en conjunto.

Los patrones obtenidos no fueron lo suficientemente claros para poder diferenciar e identificar correctamente a los microorganismos, del total de patrones únicamente se pudo identificar el correspondientes a *Geobacillus thermodenitrificans* (Figura 22) de acuerdo al patrón obtenidos en el software, sin embargo la similitud entre patrones nos permitió descartar aislados al momento de enviar a secuenciar.



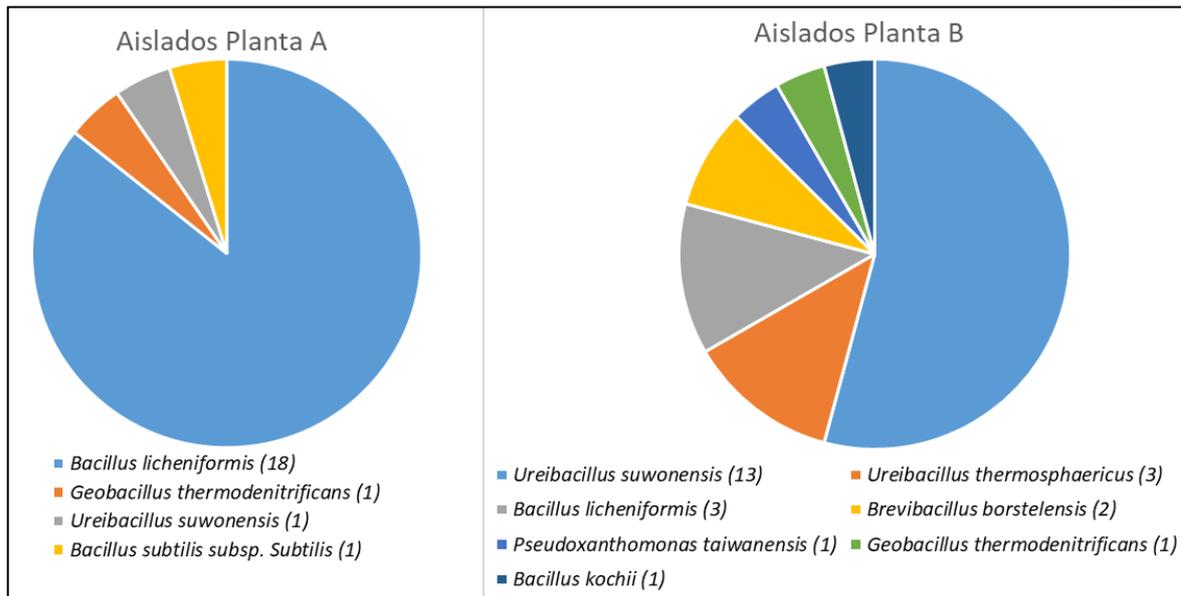
**Figura 22:** Análisis de restricción obtenido con el software Serial Cloner de *Geobacillus thermodenitrificans* (Z26928) incubado con enzima *AluI*, a partir de la secuencia obtenida del NCBI.



Para la secuenciación tipo Sanger se seleccionaron 9 aislados de la planta **A** y 14 aislados de la planta **B**, de acuerdo los patrones de restricción; se seleccionaron todos los patrones diferentes y otras al azar, con el fin de comprobar y comparar la secuenciación con los patrones de restricción obtenidos. En total se obtuvieron 8 cepas diferentes y el resto repetidas, entre estos principalmente microorganismos pertenecientes al filo de Firmicutes, género de los Bacillus, Geobacillus, Ureibacillus; así mismo se pudo aislar una cepa de Pseudoxanthomonas y una de Brevibacillus como se puede observar en la tabla 10. En la figura 23 se muestran el número de aislados obtenidos por planta de Compostaje con su respectiva identificación de acuerdo a la comparación entre la secuenciación y los patrones del PCR-RFLP. Una observación importante es que la secuenciación nos permitió diferenciar una cepa que no se pudo diferenciar en el PCR-RFLP (*Ureibacillus thermosphaericus*); otra observación importante es que la planta de compostaje **B**, posee una mayor diversidad de microorganismos termófilos en comparación a la planta **A**, de acuerdo a los aislados obtenidos; esto puede deberse al sustrato usado en cada una de ellas.

**Tabla 10.** Identificación de los aislados obtenidos a partir del cultivo de las muestras de composta a 55° C de cada una de plantas de compostaje, a través de secuenciación tipo Sanger.

Planta de Compostaje	ID de aislado	Cepa más parecida (No. acceso)	Identidad (%)
Planta EMAC	2	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_118996.1)	94
	3	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (NR_043021.2)	97
	4	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	99
	9	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_006270.3)	99
	13	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_006270.3)	97
	17	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_006270.3)	99
	18	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_006270.3)	98
	19	<i>Bacillus subtilis subso. Subtilis</i> (NC_000964.3)	99
	21	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_006270.3)	97
Planta La Italiana	23	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	97
	24	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (NR_040961.1)	99
	26	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	99
	28	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	99
	31	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	99
	33	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> (NR_113974.1)	99
	35	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	86
	36	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (NR_040961.1)	99
	38	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (NR_043021.2)	99
	41	<i>Bacillus kochii</i> (NR_117050.1)	98
	42	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_118996.1)	99
	43	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_118996.1)	99
	44	<i>Brevibacillus borstelensis</i> (NR_113799.1)	99
	46	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_118996.1)	98



**Figura 23:** Identificación de los aislados obtenidos a partir del cultivo de las muestras de compost a 55 °C de cada una de plantas de compostaje, a través de secuenciación tipo Sanger y los patrones de restricción obtenidos en el análisis de PCR-RFLP.



## 6. DISCUSIÓN

Las comunidades microbianas que colonizan ambientes naturales y/o intervenidos por el ser humano y el impacto que sobre estas tienen las condiciones físico-químicas, han sido estudiadas con mucho interés durante los últimos años (Partanen *et al.* 2010). Sin embargo, en el Ecuador los estudios sobre comunidades microbianas durante el compostaje son prácticamente nulas y/o presentan limitaciones en cuanto a resultados (Röben, 2002, Pucha *et al.*, 2015). En el presente estudio, dos plantas de compostaje a gran escala fueron evaluadas en términos de diversidad y riqueza bacteriana, así como de condiciones físico-químicas y biológicas, usando técnicas de biología molecular (PCR, DGGE); además se aislaron bacterias termófilas y se identificaron mediante la técnica de PCR-RFLP y secuenciación. Los estudios basados en el análisis tradicional de comunidades microbianas mediante cultivo directo no son lo suficientemente amplios como el que se presenta en este estudio.

La diversidad de las poblaciones bacterianas que colonizan el compostaje están muy relacionadas con el sustrato inicial, estudios realizados sobre composta por Ishii y Takii (2003) y Klammer *et al.* (2008) indican que los patrones de bandas en un DGGE varían de acuerdo al material de partida usado, en el estudio de Ishii y Takii (2003) se analizó la diversidad bacteriana a partir de sustratos de desechos de cerdos y de desechos orgánicos, obteniendo una mayor cantidad de bandas en un DGGE para muestras de desechos de cerdos que para desechos municipales; estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación, en donde se obtuvo mayor diversidad bacteriana para la planta **B** (desechos de cerdos) que en la planta **A** (desechos municipales), lo que supondría que el sustrato usado en el compostaje es un factor clave en la diversidad microbiana; al momento de realizar el análisis de agrupamientos jerárquicos se obtuvo que cada planta estaba constituida por una poblaciones diferente, sin embargo, la muestra del día 12 de la planta **A**, y las del día 14 y 41 de la planta **B** presentan similitud en algunas de sus bandas. Algunos estudios mencionan que existen grupos o familias de bacterias que independientemente del sustrato se pueden encontrar distribuidos a lo largo de todo el proceso de compostaje, como los del género *Bacillus* (Strom, 1985; Ishii *et al.*, 2000; Ishii & Takii, 2003, Ryckeboer *et al.* 2003; Takaku *et al.*, 2006) por lo tanto las plantas estudiadas pueden compartir ciertos grupos o individuos bacterianos.



De acuerdo a las fases de compostaje identificadas en este estudio se comparó las diversidades, obteniéndose que en la planta **A** la mayor diversidad se encuentra en la fase termófila; mientras que en la planta **B** la mayor diversidad se encuentra en la fase mesófila II; un estudio realizado por Ishii *et al.* (2000) analiza la sucesión de las poblaciones microbianas durante el compostaje mediante DGGE, obteniendo patrones diferentes para cada una de las fases, sugiriendo que el medio ambiente de cada una de estas fases es variable durante el compostaje; es decir la diversidad microbiana no depende únicamente del sustrato usado, sino también interviene el ambiente que se desarrolla en el proceso.

Como se observa en los resultados, en las muestras del día 12 de la planta **A** y del día 41 de la planta **B**, no se pudieron diferenciar claramente las bandas en el DGGE, esto se puede deber a una serie de factores; de acuerdo a LaMontagne *et al.* (2002) la presencia de impurezas en el ADN extraído puede afectar ciertos análisis moleculares de comunidades microbianas; igualmente los métodos de purificación del ADN pueden producir la pérdida de hasta un 63 % del ADN total extraído (Howeler *et al.* 2003), Tsai y Olson (1992) mencionan que técnicas moleculares como PCR pueden ser muy sensibles a la contaminación por ácidos húmicos afectando la amplificación, cualquiera de estas causas pudo ocasionar problemas al momento de la electroforesis o de la amplificación para dichas muestras.

El análisis del proceso de compostaje no solo involucra características referentes al sustrato, Sino también involucra características físicas y químicas tales como la temperatura, pH, la disponibilidad de nutrientes, contenido de humedad, entre otras (Takaku *et al.* 2006; Tiquia & Tam, 2000).

En el presente estudio en cuanto a temperatura interna, las dos plantas se mantuvieron en promedios mayores a 50 °C, al final del proceso se observó que la temperatura disminuyó hasta valores cercanos a la temperatura ambiental, estos resultados se respaldan en las investigaciones de Partanen *et al.* (2010), (Karadag *et al.* 2013), Ishii y Takii (2003) donde las temperaturas se mantenían cerca de 50 °C durante la mayor parte del proceso, y al final descienden hasta valores cercanos a la temperatura ambiente. En los estudios de Ishii y Takii (2003) y Poincelot (1975) los autores concluyen que la tasa de producción de calor depende del volumen de material de partida y del sustrato utilizado, debido al contenido de materiales de fácil degradación de cada uno de ellos,



igualmente afirma que la composta a partir de desechos municipales presenta un radio de producción de calor mayor que en otro tipo de sustratos (lodos depurados y desechos de cerdos); esta relación se vio claramente en el presente estudio donde para la planta **A** (desechos municipales) la mayor parte del tiempo se mantuvo la temperatura sobre los 60 °C, e inclusive alcanzando una T máxima de 80 °C; mientras que la planta **B** (desechos de cerdos) la temperatura se mantuvo entre 50 y 60 °C y obteniendo una T máxima de 62.8 °C.

De acuerdo a los estudios de Partanen (2010), Takaku *et al.* (2006) afirman que durante los primeros días del compostaje se prevé un rápido incremento en la temperatura, debido a la actividad microbiana sobre los compuestos orgánicos; mencionan que la fase termófila se alcanza rápidamente, aproximadamente en el día 2 de compostaje; en la presente investigación se afirma lo expuesto por dichos autores alcanzando la fase termófila durante los primeros días de compostaje en ambas plantas, lo que supondría una elevada actividad microbiana sobre los compuestos orgánicos.

Díaz *et al.* (2007) reportó que los mayores índices de diversidad microbiana se encuentran a temperaturas que oscilan los 30 y 45 °C; en el presente estudio los mayores índices de diversidad se obtuvieron a 60 °C en la planta **A**, y entre 40 y 50 °C en la planta **B**. Un grupo de estudios revelo que a medida que aumenta la temperatura del compostaje la cantidad de bandas en el DGGE disminuyen, por lo tanto esto sugiere que la temperatura es un factor determinante en la presencia de ciertos grupos bacterianos (Ishii *et al.* 2000, Takaku *et al.* 2006, Karadag *et al.* 2013); de igual manera un par de estudios sostienen que a medida que la temperatura empieza a disminuir, la diversidad de microorganismos aumenta (de Bertoldi *et al.* 1983, Blanc *et al.* 1999, Ryckeboer *et al.* 2003). En este estudio las poblaciones bacterianas siguen ciertos comportamientos con respecto a los cambios de temperatura, en la planta **A** se observó que los mayores índices de diversidad se obtuvieron en la etapa termófila, lo que sugiere la posible presencia de una gran diversidad de organismos termófilos, este resultado se respalda con lo reportado por Tiquia (2005) donde obtuvo mayor diversidad bacteriana en la etapa termófila de compostaje de desechos animales; y por el contrario en la planta **B** el mayor índice de diversidad se obtuvo en la etapa mesófila como lo reportan los estudios antes mencionados (Ishii *et al.* 2000, Takaku *et al.* 2006, Karadag *et al.* 2013); por ende la temperatura actúa como un factor limitante para ciertos grupos bacterianos, tal como se demuestra en el análisis la correlación entre la T interna con la diversidad de la planta **A**.



En cuanto al comportamiento del pH en este estudio no se alcanzan valores ácidos en ninguna de las plantas, los valores son alcalinos y cercanos al neutro [**A** (7.2 a 8.7), **B** (6.75 a 7.75)], estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ishii *et al.* 2000, Ishii & Takii (2003), Partanen *et al.* (2010) y Karadag *et al.* (2013) donde el pH se encuentra por valores neutros y básicos a lo largo del compostaje. Tiquia y Tam (2000) quienes trabajaron con composta a partir de deshechos de cerdos obtuvieron un comportamiento descendente en el pH desde el inicio hasta el final del proceso (de 8.6 a 6.9); en el presente estudio no se observó tal comportamiento de una forma marcada, únicamente en la planta **A** se observó un pequeño descenso en las últimas muestras al final del proceso.

Estudios mencionan que en las primeras fases del compostaje se producen altas cantidades de ácidos orgánicos, los cuales provocan la disminución del pH hasta valores ácidos, promoviendo la proliferación de hongos y levaduras; y cuando esta fase de acidificación termina se produce la amonificación, que permite incrementar el pH hasta valores neutros y alcalinos donde se promueve el desarrollo y metabolismo bacteriano (Ceglie & Abdelrahman 2014). Durante el análisis del pH se obtuvo que para las dos plantas de compostaje el pH puede intervenir en la variabilidad de la diversidad y de la riqueza bacteriana de forma positiva, esta relación se vio claramente en nuestro estudio, en la planta **B** fue más significativa que en la planta **A**; se obtuvo que a medida que aumenta el pH, la diversidad y riqueza bacteriana tendían a aumentar, lo que demuestra que el pH es un factor importante en la diversidad y riqueza bacteriana. Por otra parte Insam & Bertoldi (2007), Carbonell *et al.* (2011), Mostafid *et al.* (2012) estiman que el intervalo óptimo de pH para el desarrollo de las bacterias se encuentra entre 4.5 y 8.0; lo que pudo favorecer al desarrollo bacteriano en las muestras estudiadas.

En el análisis de la conductividad eléctrica (deciSiemens/metro) de acuerdo a un estudio realizado por Tiquia y Tam (2000) se esperaría que la conductividad aumente debido a la mineralización del N, en esta investigación la Ce aumento en las dos plantas de manera notable (**A**: 1.75 a 3.17 dS m<sup>-1</sup>, **B**: 2.36 aumento hasta 5.17); este comportamiento nos indica que existe una elevada actividad microbiana sobre los compuestos orgánicos (aceites, fenoles, alcoholes y azúcares) transformándolos en sales de alta conductividad (cloruros, nitratos, sulfatos y fosfatos), la Ce llegó a presentar cierta correlación con la riqueza bacteriana en la planta **A**, lo que sugiere que la Ce en el compostaje no representa únicamente el grado de descomposición de los compuestos



orgánicos, sino también nos indica, que concentración de sales disueltas pueden influir en la riqueza bacteriana; pero esta relación no necesariamente es constante, ya que no se encontró tal tipo de relación en la planta **B**.

Por otra parte, en cuanto al contenido de humedad en el material de partida se considera que debe estar alrededor de un 50 a 60 % para obtener un producto bien descompuesto y estable, pues la actividad microbiana cesa cuando el porcentaje de humedad es inferior al 8 % o 12 % en relación al peso; se menciona que al final del proceso el porcentaje de humedad debe ser bajo (aproximado al 30 %) para evitar actividades biológicas en el material ya estabilizado (Insam & Bertoldi 2007, Ivankin *et al.* 2014). En el presente estudio la planta **A** empezó por valores cercanos a 50 % de humedad y fue disminuyendo gradualmente hasta valores cercanos al 30 %; mientras que para la planta **B**, empezó con una humedad cercana a 64 % y descendió hasta un 52 % aproximadamente, similar a lo expuesto por Tiquia (2005) y Karadag *et al.* (2013); el descenso de la humedad se debe principalmente a la necesidad de los microorganismos para la transformación de los compuestos orgánicos en minerales solubles, por esto la humedad se relaciona significativamente con el porcentaje de M.O. y de N total; la humedad interviene mayormente en la actividad microbiana antes que en la diversidad, es decir el descenso de la humedad nos indica hasta cierto punto el grado de transformación de la materia orgánica, relación que se vio claramente en el presente estudio, a medida que desciende el porcentaje de humedad, también desciende el contenido de M.O.; pero por otra parte la relación que posee la humedad con la diversidad y riqueza bacteriana es indirecta a través del pH, el pH tiene una relación negativa con la humedad, es decir a medida que aumenta el pH el contenido de humedad disminuye y por lo tanto la diversidad y riqueza bacteriana tienden a aumentar.

La Materia orgánica cumple un rol importante en el compostaje, ya que es el principal factor de la actividad microbiana; la M.O. definirá la velocidad de degradación de los compuestos orgánicos. Durante el compostaje la mayor parte de la materia orgánica (M.O.) se transforma en CO<sub>2</sub> y Agua, al existir una mayor actividad microbiana sobre los compuestos orgánicos esta tiende a ir disminuyendo, tal como se pudo observar en la planta **A**, el contenido de M.O. empieza con un valor aproximado de 21.9 % y desciende hasta 19.7 %, y en la planta **B**, empieza con un mayor contenido de MO (79.8 %) y desciende a 61.4 % hasta el final del proceso, este comportamiento es similar al obtenido por Tiquia (2005) durante el compostaje de desechos animales; durante el análisis se



obtuvo que el contenido de M.O. tiene una relación indirecta y negativa con la diversidad y riqueza bacteriana a través del pH, es decir a medida que la M.O. disminuye el pH tiende a aumentar y de igual manera la diversidad y riqueza bacteriana. Por otro lado la M.O. se relacionaría con otros factores, de forma positiva con la humedad, la Ce, el contenido de C, N y P; y de forma negativa el contenido de K, lo que demuestra que la M.O. es un factor clave en el proceso de compostaje.

El contenido de N y C son aspectos importantes en el compostaje, en cuanto al porcentaje de N en la plata **A** se obtuvieron valores relativamente bajos y muy variables (0.07 % hasta 2.46 %) durante todo el proceso; mientras que la planta **B** tuvo un comportamiento ascendente y homogéneo (2.54 % hasta 6.32 %), en cuanto al C en la planta **A** los valores eran bajos, con una media de 12.33 %; mientras que la planta **B** tenía valores altos, con una media de 42.9 %. El contenido de N y C depende únicamente de la naturaleza del sustrato y de la mezcla de materiales, pues el contenido de minerales de los sustratos determinara el contenido de N y C del material de partida, por ejemplo, para madera como pino el contenido de N debe ser de 0.07, para restos vegetales 1.52, para papel 0.25, por lo tanto no existe un valor óptimo de N; lo que se espera es no tener valores superiores al 2% al inicio del proceso ya contenidos superiores pueden causar el desprendimiento de gases de amonio (Insam y Bertoldi 2007); por lo general el contenido de C debe estar entre 40 a 50 %, para obtener un valor adecuado de R.C/N. En si el contenido de N y de C no se relacionó significativamente con la diversidad y riqueza bacteriana, existe una relación indirecta y negativa a través del pH de forma similar a la M.O. Aun así estos factores pueden funcionar como indicadores de la actividad microbiana, como se observó en la planta **B** a medida que aumenta el contenido de N, el contenido de C disminuye, y esto se debe al proceso de transformación de la materia orgánica en minerales.

En el compostaje la actividad microbiana depende de algunos aspectos, entre estos el cociente entre el contenido de C y N, que se conoce como relación C/N (R.C/N); en la planta **A** la R.C/N es muy variable, presentando valores bajos de 5.6 y altos de 165.7 y una media de 60.9, mientras que para la planta **B** los valores son más estables con un promedio de 11.97 a lo largo del proceso; se dice que cuando la R.C/N es mayor a 40 (alto contenido de C y bajo de N), la actividad biológica tiende a disminuir y por ende los microorganismos deben oxidar el exceso de C, retardando el proceso debido a la baja



disponibilidad de N para la síntesis proteica de los microorganismos, por otro lado si la R.C/N es muy baja  $<10$  (alto contenido de N y bajo de C), el compostaje es más rápido, pero el exceso de N se desprende en forma amoniacal generando gases nocivos (Insam & Bertoldi 2007, Ceglie & Abdelrahman 2014, Antil *et al.* 2014, Ivankin *et al.* 2014); en la planta **A** los sustratos usados eran muy heterogéneos, algunos de estos con contenidos muy bajos de N, lo que llevo a tener esta variabilidad en la R.C/N, y por el otro lado en la planta **B** el material era prácticamente el mismo y mucho más homogéneo por lo que las lecturas de contenido de N eran más estables, aun así los valores del R.C/N no fueron los óptimos para ninguna de las plantas de acuerdo a Ceglie y Abdelrahman (2014), Antil *et al.* (2014), Ivankin *et al.* (2014) quienes afirman que el intervalo óptimo de R.C/N es entre 25 a 35 a lo largo del proceso. A pesar de eso Ishii y Takii (2003) analizaron los cambios a lo largo del proceso de compostaje a partir de desechos de cerdos y de desechos orgánicos, obteniendo un comportamiento normal a lo largo de los procesos con valores no mayores a 10, similares a los obtenidos en la planta **B** y en algunas muestras de la planta **A**. Durante este estudio la diversidad y riqueza microbiana no presento algún tipo de relación significativa con la R.C/N. con esto podríamos decir que el valor de la R.C/N es más importante para determinar la actividad microbiana sobre los compuestos o el grado de descomposición de los mismos, antes que de la diversidad y riqueza bacteriana.

Poincelot (1975) realizo un estudio en composta a partir de desechos municipales obteniendo porcentajes de 0.4 % a 0.7 % para P, y de 0.7 % a 1.7 % de K, comparando con los promedios obtenidos en el presente estudio de P (0.24 %) y K (1.42 %) se encuentran dentro de los valores presentados por dicho estudio, al realizar el análisis de correlación el P y el K no presentaron una relación directa con la diversidad y riqueza bacteriana; pero comparten una relación indirecta a través del pH; el P tiene una relación negativa con el pH, y el K una relación positiva con el pH, lo que sugiere que a medida que aumenta la disponibilidad de P, también incrementa el pH y la diversidad bacteriana, pero la disponibilidad de K disminuye, y viceversa.

Como se pudo observar no existe un solo factor físico o químico que limite directamente la diversidad de las comunidades bacterianas ya que existen correlaciones entre la mayoría de factores; no obstante existen ciertos factores como la temperatura y el pH que en conjunto pueden actuar como inhibidores de la diversidad, cuando presentan



valores anormales al mismo tiempo (Golueke *et al.* 1953, Strom 1985, Sundberg *et al.* 2004, Takaku *et al.* 2006). Strom (1985) manifestó que la diversidad bacteriana disminuye notablemente a medida que la temperatura sobrepasa los 60 °C, esto bajo un sistema de compostaje en laboratorio, en el presente estudio ocurrió lo contrario, durante el mayor periodo de tiempo las temperaturas se encontraron sobre los 60 °C y fueron a estas temperaturas donde se encontró la mayor diversidad bacteriana, inclusive en la planta **A** donde alcanzo una temperatura de 80 °C se obtuvo una buena diversidad bacteriana, similar a la obtenida en la etapa mesófila y de enfriamiento, por lo tanto no para este estudio la temperatura no tuvo un impacto muy grande en la diversidad bacteriana.

Un estudio realizado por Tiquia en 2005 menciona que aparte de la temperatura, otros factores como la humedad y el contenido de M.O. afectan la diversidad de las comunidades microbianas, de igual manera Watanabe *et al.* (2009) reporta una correlación entre la riqueza de las comunidades microbianas con el pH, la temperatura y la humedad durante el compostaje; para la presente investigación el análisis de correlación nos mostró que, el principal factor que podría intervenir de manera significativa en la variabilidad de la diversidad y la riqueza es el pH, ya que a medida que la diversidad aumenta en ambas plantas el valor del pH tiende a aumentar; pero de igual manera factores como la humedad, M.O, Ce, Nt, C org, P y K se relacionan indirectamente con esta diversidad bacteriana a través del pH. De acuerdo a Ishii y Takii (2003) las poblaciones microbianas que proliferan durante el proceso de compostaje dependen en gran parte de las condiciones del entorno, y que el tipo de población es seleccionada a través de los materiales de la composta.

En el presente estudio a pesar de las limitaciones que conllevó el aislamiento de microorganismos a través del método tradicional de cultivo, se pudo obtener 45 aislados a 55 °C provenientes de las diferentes muestras de composta; del total de aislados la mayoría pertenecen al filo Firmicutes y a los géneros Bacillus, Ureibacillus y Geobacillus; estos resultados coinciden con los reportados para la mayoría de estudios referentes a bacterias presentes durante la fase termófila del compostaje de acuerdo a Strom (1985), Blanc *et al.* (1997, 1999), Peters *et al.* (2000), Ishii *et al.* (2000), Hassen *et al.* (2001), Ryckeboer *et al.* (2003), Takaku *et al.* (2006), Partanen *et al.* (2010) y Cihan *et al.* (2012) donde mencionan que las poblaciones bacterianas que prevalecen sobre estas temperaturas (> 50° C), son las correspondientes al filo Firmicutes, entre estas el género



más común es *Bacillus*, seguido por *Ureibacillus* y *Geobacillus*; respaldando lo obtenido en el presente estudio. Igualmente Ng *et al.* (2009) han reportado el aislamiento de más de 100 cepas de *Geobacillus sp.* a partir del compostaje de cascarilla de arroz y estiércol de cerdo durante esta etapa.

Estudios sobre la presencia de diferentes poblaciones microbianas en el compostaje demuestran que durante la fase termófila proliferen bacterias Gram-positivas y algunas formadoras de esporas como las pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Thermoactinomyces* (Partanen *et al.* 2010). En el presente estudio no se encontraron microorganismos pertenecientes al género *Thermoactinomyces*, pero si pertenecientes al género *Bacillus*, principalmente *Bacillus licheniformis* (NR\_118996.1); también aisló *Bacillus subtilis* (NC\_000964.3) y *Bacillus kochii* (NR\_117050.1); otras de las cepas más comunes aislados fueron *Ureibacillus suwonensis* (NR\_043232.1), *Geobacillus thermodenitrificans* (NR\_043021.2) y *Ureibacillus thermosphaericus* (NR\_040961.1), microorganismos reportados anteriormente en estudios de compostaje (Strom 1985, Ryckeboer *et al.* 2003, Charbonneau *et al.* 2012). En el estudio realizado por Ryckeboer *et al.* (2003) expone que *B. licheniformes* está presente en todas las fases del compostaje, por lo tanto no es específico para una fase. En el presente estudio se aislaron e identificaron microorganismos no comunes pertenecientes al género *Brevibacillus* y *Pseudoxanthomonas*, aun así estos microorganismos han sido previamente reportados en Takaku *et al.* (2006), Cihan *et al.* (2012), Karadag *et al.* (2013) durante la fase termófila del compostaje.

Partanen *et al.* (2010) nos menciona que cuando la temperatura alcanza la correspondiente a la fase termófila, la cantidad de bacterias Gram-negativas disminuye notablemente; sugiriendo que las diferentes familias bacterianas están correlacionadas con factores físicos y químicos que se presentan a lo largo del compostaje; igualmente Watanabe *et al.* (2009) nos dice que pueden existir ciertos factores que son determinantes para la aparición o no de ciertos grupos bacterianos, por ejemplo Karadag *et al.* (2013) logro aislar microorganismos pertenecientes al género *Geobacillus* y *Pseudoxanthomonas* en muestras de composta a 80 °C, en nuestro estudio se aisló microorganismos pertenecientes al género *Geobacillus* entre 45 y 55 °C, y *Pseudoxanthomonas* se aisló a 56 °C; por lo tanto no siempre la temperatura actúa como un factor decisivo para la presencia o no de determinados grupos bacterianos.



Durante la fase termófila en la planta **A** se produjo un incremento en el pH, esto se puede deber a la presencia de especies del género *Bacillus*, ya que se conoce que secreta enzimas catabólicas como proteasas capaces de incrementar el pH a través de proteólisis (Watanabe *et al.* 2009)

Para la identificación de dichos aislados se usó la técnica de PCR-RFLP, según Kuisiené *et al.* (2007) la mejor resolución en patrones de corte para identificar microorganismos del género *Geobacillus* se obtiene con enzimas de restricción tipo *AluI*; según Blanc *et al.* (1997) la técnica de PCR-RFLP es una herramienta útil para la identificación de nuevas cepas de bacilos termófilos. Para este estudio la técnica presentó ciertas dificultades al momento de la electroforesis, donde no se obtuvieron patrones de restricción claros y bien marcados, las condiciones, materiales y equipos usados pueden interferir en los resultados, a pesar de eso se pudo identificar a *Geobacillus thermodenitrificans* de acuerdo al patrón obtenido en el software Serial Cloner.



## 7. CONCLUSIONES

El estudio de las comunidades bacterianas nos permite determinar qué ambiente es más diverso que otro, en este estudio se analizaron dos plantas de compostaje a gran escala, cada una con diferentes condiciones de sustrato, ubicación y condiciones físicas y químicas, se estimó la diversidad para cada una de las plantas donde se obtuvo que:

No existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad y la riqueza entre las dos plantas estudiadas; por lo tanto no se puede asegurar que la diversidad y la riqueza están relacionadas directamente con el sustrato utilizado.

De acuerdo al análisis jerárquico se demostró que existen agrupamientos de poblaciones con respecto a cada uno de los sustratos, por lo tanto el tipo de sustrato determinará el tipo de población bacteriana que se desarrolle en el compostaje, más no la diversidad.

Ciertos grupos bacterianos no dependen del sustrato utilizado, sino de las condiciones que se desarrollen durante el proceso. Por lo tanto, procesos de compostaje con sustratos diferentes, pero con condiciones similares, pueden llegar a compartir grupos bacterianos.

Al momento de analizar la relación de las condiciones físicas y químicas de cada planta de compostaje con la diversidad y riqueza bacteriana, se encontraron algunas relaciones importantes que nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

A pesar de que no se encontró una relación significativa entre la temperatura y la diversidad bacteriana, se obtuvo comportamientos diferentes de la diversidad en cada una de las plantas de acuerdo a las fases del compostaje, en la planta de la Emac se obtuvo la mayor diversidad en la etapa termófila, mientras que en la planta de la Italiana se obtuvo una mayor diversidad en la etapa mesófila, lo que en cierto punto dependería de la temperatura.

El pH fue el único factor clave que comparte una relación directa y positiva con la diversidad y riqueza bacteriana; es decir a medida que aumenta el pH, la diversidad y riqueza bacteriana tiende a aumentar.

Al tener el pH una relación directa con la diversidad y riqueza bacteriana, le permite al resto de variables compartir una relación indirecta; en este caso sería una relación negativa con la humedad, la M.O., el Nt, el C org., la R.C/N, y el contenido de P, es decir



a medida que aumenta el pH y la diversidad bacteriana, el resto de variables tiende a disminuir; a excepción del K que comparte una relación positiva con el pH, por lo tanto a medida que incrementa el pH y la diversidad, el contenido de K también incrementa.

La Ce o la concentración de sales solubles puede influir de manera positiva en la riqueza bacteriana, pero bajo ciertas condiciones, ya que esta relación no se observó en las dos plantas estudiadas.

En cuanto a los análisis físicos y químicos se puede concluir que:

El comportamiento de la temperatura interna, la R.C/N y el contenido de Mg, es independiente del tipo de sustrato utilizado; mientras que la variabilidad del pH, la Ce, la humedad, el contenido de M.O., la concentración de N, C org., P, K, Ca y S a lo largo del compostaje, está relacionados directamente con el sustrato..

El incremento del pH en la planta **A**, durante la fase termófila, se puede deber a la presencia de especies del género *Bacillus* (*Bacillus lincheniformis*), ya que se conocen que secretan enzimas catabólicas como proteasas capaces de incrementar el pH.

En cuanto al aislamiento e identificación de bacterias termófilas, los individuos más comunes pertenecen al filo de los Firmicutes y a los géneros *Bacillus*, *Ureibacillus* y *Geobacillus*.

Para la composta a partir de desechos municipales los microorganismos más comunes identificados fueron *Bacillus lincheniformis*; mientras que para la composta a partir de desechos de cerdo los microorganismos más comunes fueron *Ureibacillus suwonensis*, *Ureibacillus thermosphaericus* y *Bacillus lincheniformis*. Por lo tanto el sustrato puede determinar el tipo de población microbiana que se desarrolle durante la fase termófila; aunque es posible encontrar ciertos grupos bacterianos que independientemente del sustrato pueden estar presentes en el compostaje como los del género *Bacillus* y *Ureibacillus*.

La técnica de PCR-RFLP nos permitió identificar un patrón correspondiente a *Geobacillus thermodenitrificans*.

Los patrones de restricción obtenidos permitieron diferenciar unos microorganismos de otros, y agrupar poblaciones bacterianas correspondientes a cada una de las plantas de compostaje.



## 8. RECOMENDACIONES

Realizar estudios similares con procesos de compostaje a escala y/o bajo condiciones controladas de temperatura y pH, para observar el comportamiento de las poblaciones microbianas.

Realizar estudios con sustratos diferentes a los analizados en el presente estudio.

Mediante secuenciación identificar y diferenciar las poblaciones bacterianas de cada una de las plantas de compostaje estudiadas.

Manejar diferentes condiciones de temperatura, medio de cultivo y pH al momento de realizar el aislamiento mediante cultivos de enriquecimiento.

Usar diferentes enzimas de restricción en la técnica de PCR-RFLP para obtener patrones más exactos que nos permitan diferenciar claramente entre especies.

Realizar estudios de funcionalidad enzimática con los microorganismos aislados en la etapa termófila debido a su importancia biotecnológica, es importante conocer que enzimas son las encargadas de degradar o descomponer un determinado sustrato y entender los roles que desempeña cada uno de los grupos bacterianos durante el compostaje.

En cuanto a la metodología se recomienda:

Usar un volumen mayor de muestra (>0.25 g) para poder asegurar que se está trabajando con un volumen que representaría la población real microbiana.

Se debe purificar el ADN de las muestras para evitar la posible presencia de inhibidores como ácidos húmicos que pueden afectar el análisis molecular.

Evitar la presencia de sustratos con baja carga de N (Lignina) para evitar altos valores en la R.C/N, que afectaría el metabolismo microbiano.

La técnica de PCR-RFLP para el análisis de la región 16S del ADNr, es una herramienta que se puede usar para visualizar patrones de comunidades bacterianas por fases del compostaje.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, JDW; Frostick, LE. 2009. Analysis of bacterial activity, biomass and diversity during windrow composting. *Waste Management* 29(2): 598-605.

Adrio, JL; Demain, AL. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4(1): 117-139.

Antil, RS; Raj, D; Abdalla, N; Inubushi, K. 2014. Physical, Chemical and Biological Parameters for Compost Maturity Assessment: A Review. *Composting for Sustainable Agriculture*. s.l., Springer International Publishing, p.83-101.

Beffa, T; Blanc, M; Marilley, L; Fischer, JL; Lyon, P-F; Aragno, M. 1996. Taxonomic and Metabolic Microbial Diversity During Composting. *The Science of Composting*. Dordrecht, Springer Netherlands, p.149-161.

de Bertoldi, M; Vallini, G; Pera, A. 1983. The Biology of Composting: a Review. *Waste Management & Research* 1(1): 157-176.

Bhattacharya, A; Pletschke, BI. 2014. Thermophilic Bacilli and their Enzymes in Composting. *Composting for sustainable Agriculture*. s.l., Springer International Publishing, p.103-124.

Blanc, M; Marilley, L; Beffa, T; Aragno, M. 1997. Rapid Identification of Heterotrophic, Thermophilic, Spore-Forming Bacteria Isolated from Hot Composts. *International Journal of systematic Bacteriology* 47(22): 1246-1248.

Blanc, M; Marilley, L; Beffa, T; Aragno, M. 1999. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular ( 16S rDNA ) methods. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 141-149.

Brons, JK; van Elsas, JD. 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and environmental microbiology* 74(9): 2717-27.

Buermans, HPJ; Dunnen, JT Den. 2014. Impressive progress has been made in the field of Next Generation Sequencing. *BBA - Molecular Basis of Disease* 2014.

Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion*



in Microbiology 6(3): 213-218.

Calderoli, P. 2016. Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos. s.l., 238 p.

Carbonell, G; Imperial, RM de; Torrijos, M; Delgado, M; Rodriguez, JA. 2011. Effects of municipal solid waste compost and mineral fertilizer amendments on soil properties and heavy metals distribution in maize plants (*Zea mays L.*). Chemosphere 85(10): 1614-1623.

Ceglie, FG; Abdelrahman, HM. 2014. Ecological Intensification through Nutrients Recycling and Composting in Organic Farming. Composting for Sustainable Agriculture. s.l., Springer International Publishing, p.1-22.

Champdore, M De; Staiano, M; Rossi, M; D'Auria, S. 2007. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. Journal of the Royal Society Interface 4: 183-191.

Charbonneau, DM; Meddeb-Mouelhi, F; Boissinot, M; Sirois, M; Beauregard, M. 2012. Identification of Thermophilic Bacterial Strains Producing Thermotolerant Hydrolytic Enzymes from Manure Compost. Indian Journal of Microbiology 52(1): 41-47.

Cihan, A; Tekin, N; Ozcan, B; Cokmus, C. 2012. The genetic diversity of genus. Brazilian Journal of Microbiology 2012: 309-324.

D'Auria, S; Barone, R; Rossi, M; Nucci, R; Barone, G; Fessas, D; Bertoli, E; Tanfani, F. 1997. Effects of temperature and SDS on the structure of beta-glycosidase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. The Biochemical journal 323: 833-840.

D'Auria, S; Moracci, M; Febbraio, F; Tanfani, F; Nucci, R; Rossi, M. 1998. Structure-function studies on B-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. Molecular bases of thermostability. The Biochemical journal 80: 949-957.

Diaz-Raviña, M; Acea, MJ; Carballas, T. 1989. Microbiological characterization of four composted urban refuses. Biological Wastes 30(2): 89-100.

Diaz, L; Bertoldi, M; Bidlingmaier, W; Stentiford, E. 2007. Compost science and Technology. Eds. L Diaz; M Bertoldi; W Bidlingmaier; E Stentiford. First edit Oxford, Copyright © 2007 Elsevier Ltd., v.8, 381.



Durand, L; Planchon, S; Guinebretiere, MH; Carlin, F; Remize, F. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. Food Microbiology 45(PA): 103-110.

Epstein, E. 1997. The Science of Composting. Florida, CRC Press, 489.

Fernández, R; Le, S. 1987. DGGE : electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. Mexico, s.e., p.149-174.

Gaona, J; Garza, Y; Rodríguez, J; Martínez, G. 2012. Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. CienciAcierta.uadec.mx 29.

Golueke, CG; Card, BJ; McGauhey, P. 1953. A Critical Evaluation of Inoculums in composting. 1953.

Guo, LB; Gifford, M. 2002. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. Global Change Biology 8: 345-360.

Hassen, A; Belguith, K; Jedidi, N; Cherif, A; Cherif, M; Boudabous, A. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Bioresource Technology 80(3): 217-225.

Howeler, M; Ghiorse, WC; Walker, LP. 2003. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. 54: 37-45.

Iiyama, K; Stone, BA; Macauley, BJ. 1994. Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 60(5): 1538-1546.

Insam, H; Bertoldi, M De. 2007. Microbiology of the Composting Process. Compost science and Technology. s.l., Elsevier Ltd, v.8, p.363.

Ishii, K; Fukui, M; Takii, S. 2000. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Journal Applied Microbiology 89: 768-777.

Ishii, K; Takii, S. 2003. Comparison of microbial communities in four different



composting processes as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal Applied Microbiology* 95: 109-119.

Ivankin, AN; Pandya, U; Saraf, M. 2014. Intensification of Aerobic Processing of the Organic Wastes into Compost. *Composting for Sustainable Agriculture*. s.l., Springer International Publishing, p.23-42.

Karadag, D; Özkaya, B; Ölmez, E; Nissilä, ME; Çakmakçı, M; Yildiz, Ş; Puhakka, JA. 2013. Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. *International Biodeterioration and Biodegradation* 77: 85-90.

Klammer, S; Knapp, B; Insam, H; Teresa, M; Abate, D; Ros, M; Teresa, M; Abate, D. 2008. Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. *Waste Management & research* 26: 173-187.

Von klopotek, A. 1962. Über das Vorkommen und Verhalten von Schimmelpilzen bei der Kompostierung städtischer Abfallstoffe. no.1907.

Kuisienė, N; Raugalas, J; Citavicius, D. 2007. Identification of *Geobacillus stearothermophilus* by restriction digestion with Alu I of the amplified 16S rDNA. *Biologija* 53(4): 62-66.

Kuisiene, N; Raugalas, J; Stuknyte, M; Chitavichius, D. 2007. Identification of the genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S - 23S rRNA gene internal transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters* 277: 165-172.

Kwon, EJ; Jeong, YS; Kim, YH; Kim, SK; Na, HB; Kim, J; Yun, HD; Kim, H. 2010. Construction of a Metagenomic Library from Compost and Screening of Cellulase- and Xylanase-positive Clones. *J. Korean Soc. Applied biology & Chemistry* 53(6): 702-708.

LaMontagne, MG; Michel, FC; Holden, PA; Reddy, CA. 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods* 49: 255-264.

Li, R; Li, L; Huang, R; Sun, Y; Mei, X; Shen, B; Shen, Q. 2014. Variations of culturable thermophilic microbe numbers and bacterial communities during the thermophilic phase of composting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(6): 1737-1746.

MacGregor, S; Miller, F; Psarianos, K; Finstein, M. 1981. *Composting Process Control*



Based on Interaction Between Microbial Heat Output and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 41(6): 1321-1330.

Madigan, M; Martinko, J; Dunlap, P; Clark, D. 2009. *Brock : biología de los microorganismos*. 12 va Madrid, Pearson Addison Wesley.

Mahimairaja, S; Bolan, NS; Hedley, MJ. 1995. Agronomic effectiveness of poultry manure composts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 26(11-12): 1843-1861.

Marchant, R; Banat, I. 2010. The Genus *Geobacillus* and Hydrocarbon Utilization. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. s.l., s.e., p.1888-1896.

Martínez, N. 2013. Organismos que actúan durante las diferentes etapas del compostaje. Consultado 9 nov. 2017. Disponible en [http://bq2013.blogspot.com/2013\\_05\\_01\\_archive.html](http://bq2013.blogspot.com/2013_05_01_archive.html)

Mitchell, K; Takacs-vesbach, C. 2008. A comparison of methods for total community DNA preservation and extraction from various thermal environments. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1139-1147.

Mostafid, ME; Shank, C; Imhoff, PT; Yazdani, R. 2012. Gas transport properties of compost-woodchip and green waste for landfill biocovers and biofilters. *Chemical Engineering Journal* 191: 314-325.

Muyzer, G; De Waal, EC; Uitterlinden, AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700.

Ng, IS; Li, CW; Yeh, YF; Chen, PT; Chir, JL; Ma, CH; Yu, SM; Ho, THD; Tong, CG. 2009. A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles* 13(3): 425-435.

Olson, DG; McBride, JE; Joe Shaw, A; Lynd, LR. 2012. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology* 23(3): 396-405.

Partanen, P; Hultman, J; Paulin, L; Auvinen, P; Romantschuk, M. 2010. Bacterial



diversity at different stages of the composting process. *BMC microbiology* 10: 94.

Peters, S; Koschinsky, S; Schwieger, F; Tebbe, CC. 2000. Succession of Microbial Communities during Hot Composting as Detected by PCR – Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based Genetic Profiles of Small-Subunit rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 930-936.

The biochemistry and methodology of composting (754, 1975, New Haven). 1975. Ed. Poincelot, R. New Haven, v.754.

The Freedonia group. 2016. The Freedonia group: World enzyme demand to reach \$7.2 Billion. CISION PR Newswire. Cleveland. US. jun 27.13:19.

Verificación y cuantificación de microorganismos involucrados en el proceso de compostaje aerotérmico de residuos de producción orgánica certificada. (2015, Chimborazo). 2015. Ed. Pucha, A; Ramos, R; Morales, R; Novoa, V; Romero, F. Chimborazo, 4 p.

Manual de Compostaje Para Municipios (2002, Loja, Ecuador). 2002. Ed. Röben, E. Loja, Ecuador,

Rodríguez-Santiago, B; Armengol, L. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnostico Prenatal* 23(2): 56-66.

Ryckeboer, J; Cops, S; Coosemans, J. 2002. The fate of plant pathogens and seeds during anaerobic digestion and aerobic composting of source separated household wastes. *Compost Science and Utilization* 10(3): 204-216.

Ryckeboer, J; Mergaert, J; Coosemans, J; Deprins, K; Swings, J. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. 2003: 127-137.

Ryckeboer, J; Mergaert, J; Vaes, K; Klammer, S. 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology* 53(4): 349-410.

Sifour, M; Saeed, H; Zaghloul, T; Berekaa, M; Abdel-fattah, Y. 2010. Isolation of Lipase Gene of the Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Strain-5. *Biotechnology* 1(9): 55-60.



- Strom, PF. 1985. Effect of Temperature on Bacterial Species Diversity in Thermophilic Solid-Waste Composting. *Applied and Environmental Microbiology* 50(4): 899-905.
- Strom, PF. 1985. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology* 50(4): 906-913.
- Sun, Y; Sriramajayam, K; Luo, D; Liao, DJ. 2012. A Quick, cost-free method of purification of DNA fragments from agarose gel. *Journal of Cancer* 3(1): 93-95.
- Sundberg, C; Smårs, S; Jönsson, H. 2004. Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. *Bioresource Technology* 95(2): 145-150.
- Takaku, H; Kodaira, S; Kimoto, A; Nashimoto, M. 2006. Microbial Communities in the Garbage Composting with Rice Hull as an Amendment Revealed by Culture-Dependent and -Independent Approaches. *Journal* 101(1): 42-50.
- Templeton, GF. 2011. A Two-Step Approach for Transforming Continuous Variables to Normal Implications and Recommendations for IS Research. *Communication of the Association for Information Systems* 28.
- Thomas, T; Gilbert, J; Meyer, F. 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentación* 2: 1-12.
- Tiquia, SM. 2005. Microbial community dynamics in manure composts based on 16S and 18S rDNA T-RFLP profiles. *Environmental technology* 26(10): 1101-1113.
- Tiquia, SM; Tam, NFY. 2000. Co-composting of spent pig litter and sludge with forced-aeration. 72.
- Tsai, Y-L; Olson, BH. 1992. Detection of Low Numbers of Bacterial Cells in Soils and Sediments by Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58(2): 754-757.
- Watanabe, K; Nagao, N; Toda, T; Kurosawa, N. 2009. The dominant bacteria shifted from the order “ Lactobacillales ” to Bacillales and Actinomycetales during a start-up period of large-scale , completely-mixed composting reactor using plastic bottle flakes as bulking agent. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 803-811.

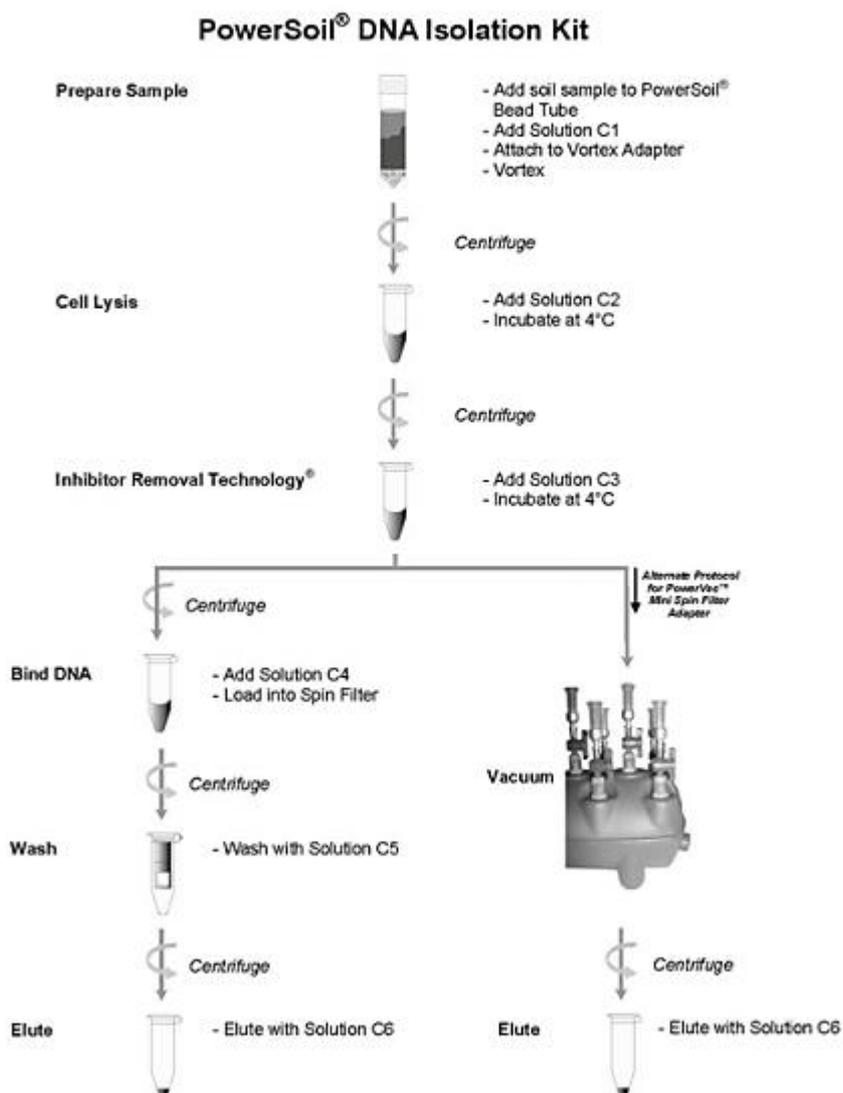


Zeigler, DR. 2015. The Geobacillus paradox : why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet ? Microbiology 160(2014): 1-11.



## 10. ANEXOS

**Anexo 1:** Diagrama de Flujo del protocolo de Extracción de ADN total (metagenómico) para las muestras de compost usando el Kit Powersoil® DNA isolation kit (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU).

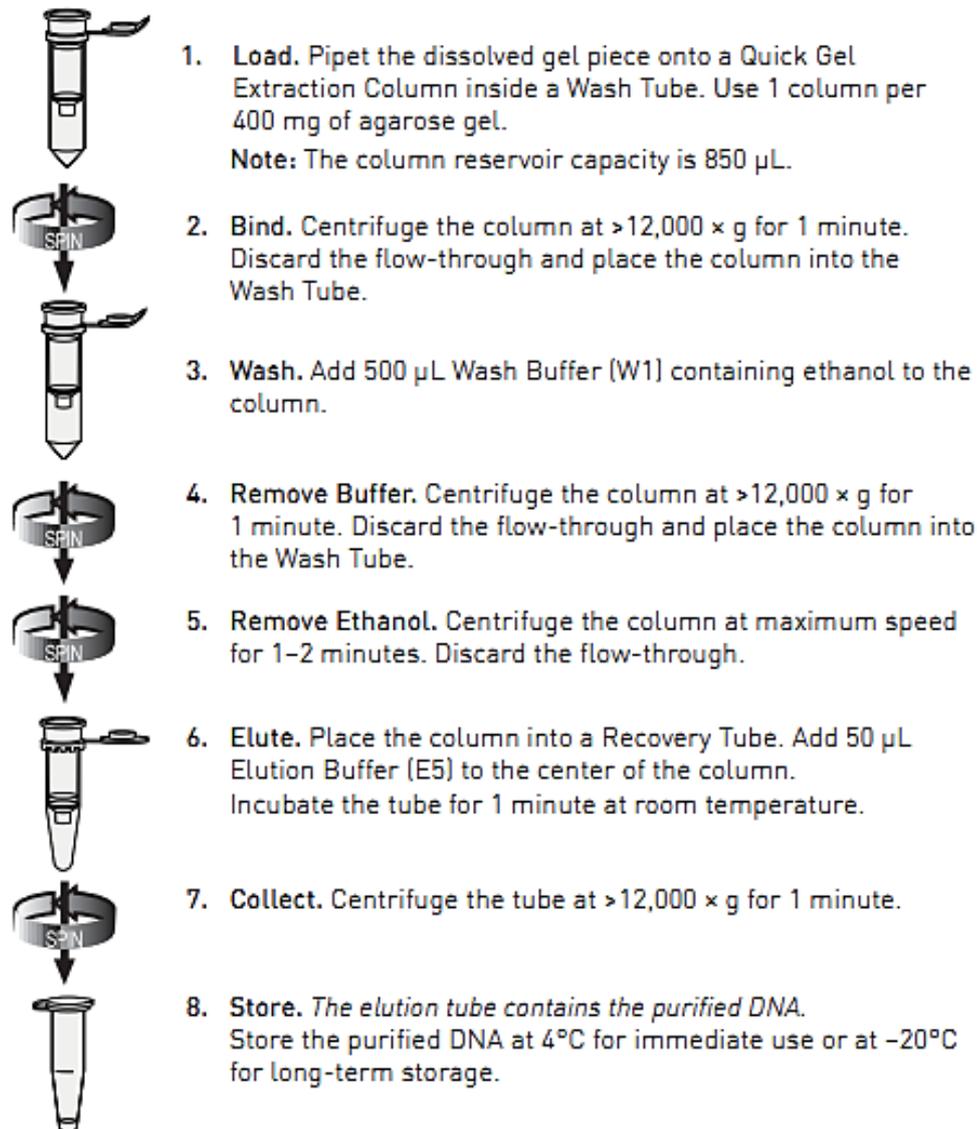


**Anexo 2:** Diagrama de flujo para el protocolo de purificación de ADN total extraído de las muestras de compost, usando el kit PureLink™ Quick gel extraction (Invitrogen).

## Purifying DNA Using a Centrifuge

### Before Starting

Add ethanol to the Wash Buffer (W1) according to the label on the bottle.



**Anexo 3:** Valores de cuantificación del ADN total (metagenómico) después de extracción y purificación de las muestras de compost

muestra	Concentración de ADN		Promedio	unidades
	Lectura 1	Lectura 2		
1067	0.0221	0.0214	0.0218	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1068	0.0512	0.0471	0.0492	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1069	0.00263	0.00247	0.0026	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1070	0.0057	0.00554	0.0056	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1071	0.00664	0.00644	0.0065	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1072	0.0367	0.0351	0.0359	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$



1073	0.00894	0.0085	0.0087	µg/µl
1074	0.0281	0.0271	0.0276	µg/µl
1075	0.0106	0.0103	0.0105	µg/µl
1076	0.0225	0.0222	0.0224	µg/µl
1077	0.0163	0.0157	0.0160	µg/µl
1078	0.00333	0.00333	0.0033	µg/µl
1079	0.00278	0.00268	0.0027	µg/µl
1080	0.00556	0.00544	0.0055	µg/µl
1081	0.00322	0.00266	0.0029	µg/µl
1082	0.0265	0.0264	0.0265	µg/µl
1083	0.0156	0.0149	0.0153	µg/µl
1084	0.00442	0.00433	0.0044	µg/µl
1085	0.0182	0.0177	0.0180	µg/µl
1086	0.0431	0.0434	0.0433	µg/µl

**Anexo 4:** Cuantificación del Producto de PCR de la región 16S del ARNr del ADN total de las muestras de compost.

muestra	Concentración Actual de ADN		Promedio	unidades
	Lectura 1	Lectura 2		
1067	0.0344	0.0324	0.0334	µg/µl
1068	0.0194	0.0187	0.01905	µg/µl
1069	0.0282	0.0266	0.0274	µg/µl
1070	0.0332	0.0306	0.0319	µg/µl
1071	0.0318	0.03	0.0309	µg/µl
1072	0.0128	0.012	0.0124	µg/µl
1073	0.0376	0.0362	0.0369	µg/µl
1074	0.0182	0.0179	0.01805	µg/µl
1075	0.023	0.0224	0.0227	µg/µl
1076	0.0274	0.0266	0.027	µg/µl
1077	0.037	0.0368	0.0369	µg/µl
1078	0.0398	0.0382	0.039	µg/µl
1079	0.0326	0.0326	0.0326	µg/µl
1080	0.0256	0.0252	0.0254	µg/µl
1081	0.025	0.0244	0.0247	µg/µl
1082	0.0372	0.032	0.0346	µg/µl
1083	0.0165	0.0158	0.01615	µg/µl
1084	0.0234	0.0232	0.0233	µg/µl
1085	0.0171	0.016	0.01655	µg/µl
1086	0.0302	0.0286	0.0294	µg/µl

**Anexo 5:** Análisis estadístico de las variables en estudio.



• **Temperatura interna (°C)**

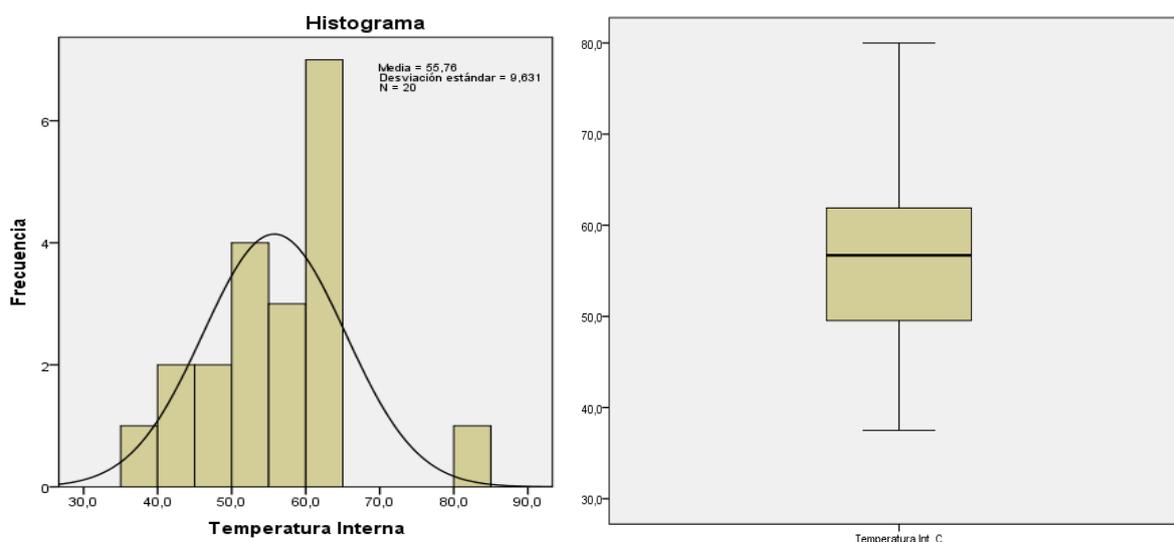
**Tabla 11:** Estadísticos descriptivos de la variable física Temperatura interna (° C) de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Temperatura Interna	Media	55.760	2.1536	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	51.253	
		Límite superior	60.267	
	Media recortada al 5%	55.428		
	Mediana	56.700		
	Varianza	92.758		
	Desviación estándar	9.6311		
	Mínimo	37.5		
	Máximo	80.0		
	Rango	42.5		
	Rango intercuartil	13.0		
	Asimetría	.209	.512	
	Curtosis	1.164	.992	

**Tabla 12:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable física Temperatura interna.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Temperatura Interna	.945	20	.302

La tabla 12 nos permite observar que la variable Temperatura interna posee una distribución normal.



**Figura 24:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable física Temperatura interna.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 24 que la variable temperatura interna no presenta datos atípicos.



• **Humedad (%)**

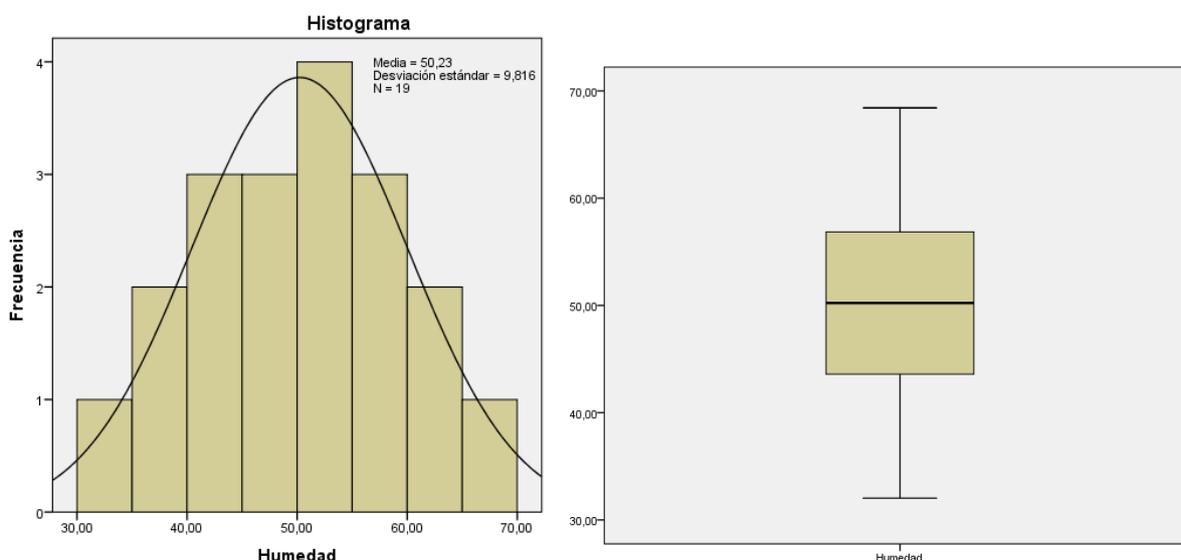
**Tabla 13:** Estadísticos descriptivos de la variable física Humedad (%) de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Humedad	Media	50.2300	2.25187	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	45.4990	
		Límite superior	54.9610	
	Media recortada al 5%	50.2300		
	Mediana	50.2300		
	Varianza	96.348		
	Desviación estándar	9.81569		
	Mínimo	32.04		
	Máximo	68.42		
	Rango	36.38		
	Rango intercuartil	14.92		
	Asimetría	.000	.524	
	Curtosis	-.575	1.014	

**Tabla 14:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable física Humedad.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Humedad	.993	19	1.000

La tabla 14 nos permite observar que la variable Humedad posee una distribución normal.



**Figura 25:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable física Humedad.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 25 que la variable Humedad no presenta datos atípicos.



• pH

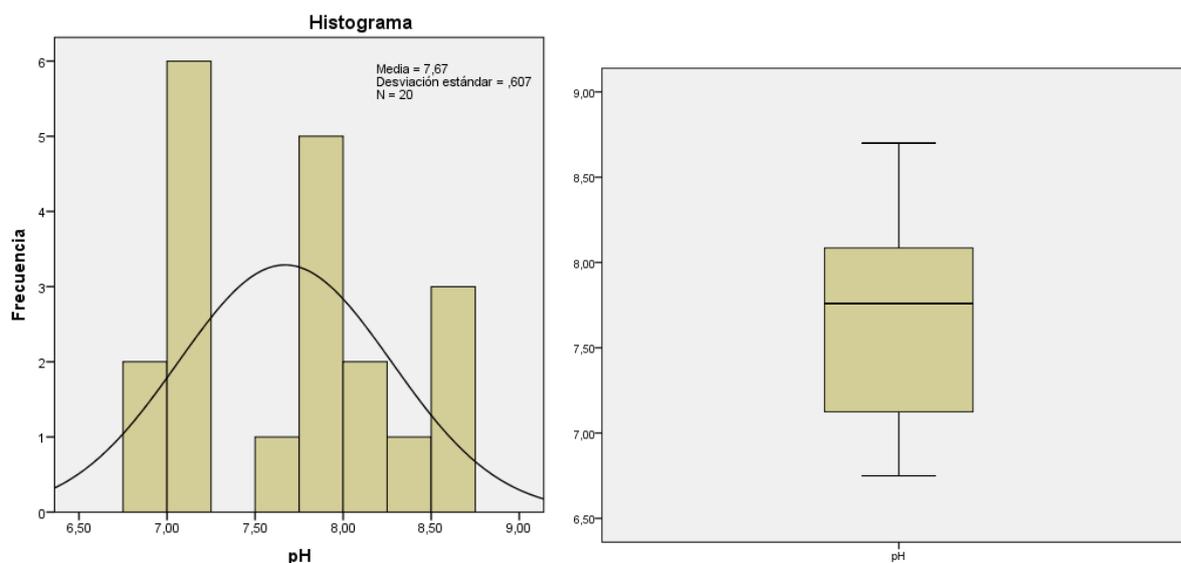
**Tabla 15:** Estadísticos descriptivos de la variable química pH de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
pH	Media	7.6695	.13564	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	7.3856	
		Límite superior	7.9534	
	Media recortada al 5%	7.6633		
	Mediana	7.7600		
	Varianza	.368		
	Desviación estándar	.60659		
	Mínimo	6.75		
	Máximo	8.70		
	Rango	1.95		
	Rango intercuartil	.99		
	Asimetría	.175	.512	
	Curtosis	-1.128	.992	

**Tabla 16:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química pH.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
pH	.944	20	.283

La tabla 16 nos permite observar que la variable pH posee una distribución normal.



**Figura 26:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química pH.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 26 que la variable pH no presenta datos atípicos.



• **Conductividad eléctrica (dSm-1)**

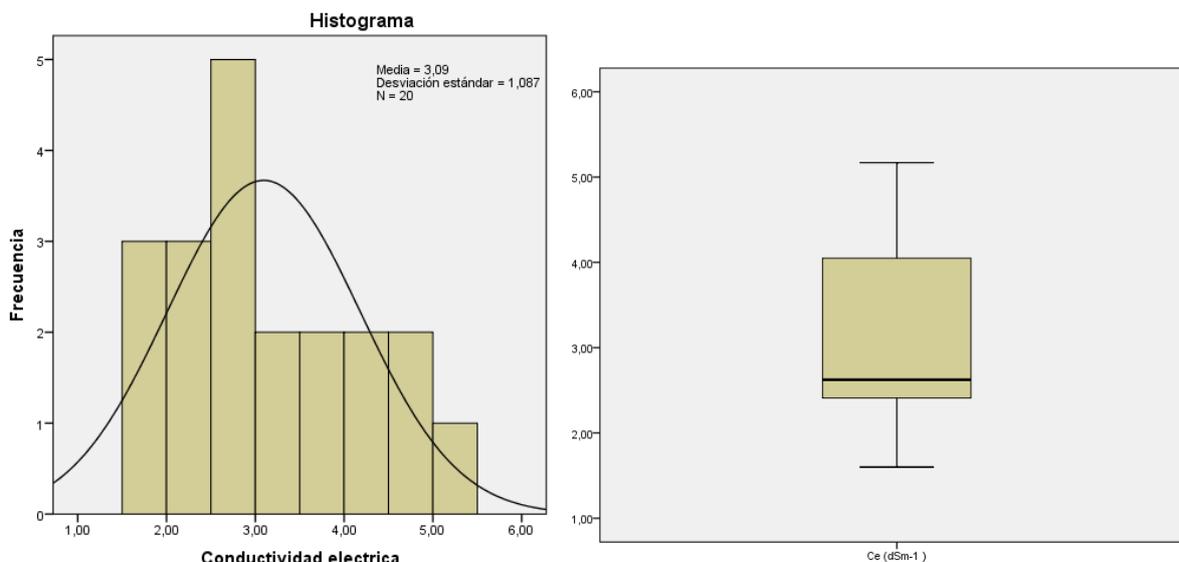
**Tabla 17:** Estadísticos descriptivos de la variable química Conductividad eléctrica de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Conductividad eléctrica	Media	3.0945	.24303	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	2.5858	
		Límite superior	3.6032	
	Media recortada al 5%	3.0622		
	Mediana	2.6250		
	Varianza	1.181		
	Desviación estándar	1.08685		
	Mínimo	1.60		
	Máximo	5.17		
	Rango	3.57		
	Rango intercuartil	1.79		
	Asimetría	.489	.512	
	Curtosis	-.967	.992	

**Tabla 18:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Conductividad eléctrica.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Conductividad eléctrica	.924	20	.119

La tabla 18 nos permite observar que la variable pH posee una distribución normal.



**Figura 27:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Conductividad eléctrica.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 27 que la variable Conductividad eléctrica no presenta datos atípicos.



• **Materia Orgánica (%)**

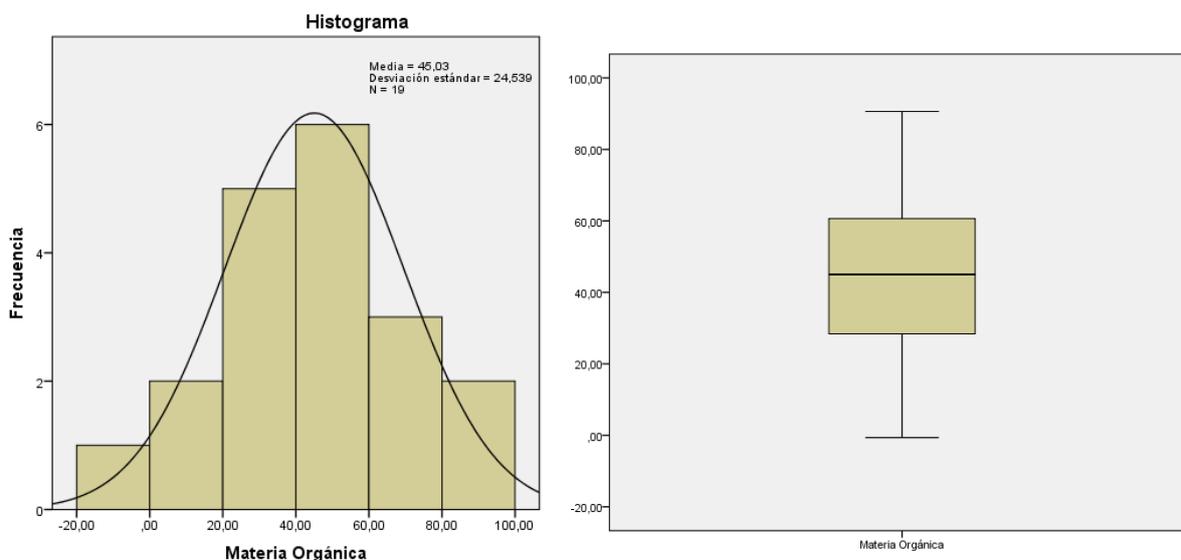
**Tabla 19:** Estadísticos descriptivos de la variable biológica Materia Orgánica de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Materia Orgánica	Media	45.0320	5.62969	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	33.2045	
		Límite superior	56.8596	
	Media recortada al 5%	45.0345		
	Mediana	45.0100		
	Varianza	602.175		
	Desviación estándar	24.53926		
	Mínimo	-.60		
	Máximo	90.62		
	Rango	91.22		
	Rango intercuartil	37.41		
	Asimetría	.011	.524	
	Curtosis	-.587	1.014	

**Tabla 20:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable biológica Materia Orgánica

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Materia Orgánica	.990	19	.999

La tabla 20 nos permite observar que la variable Materia orgánica posee una distribución normal.



**Figura 28:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable Biológica Materia Orgánica

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 28 que la variable Materia Orgánica no presenta datos atípicos.



• **Carbón Orgánico (%)**

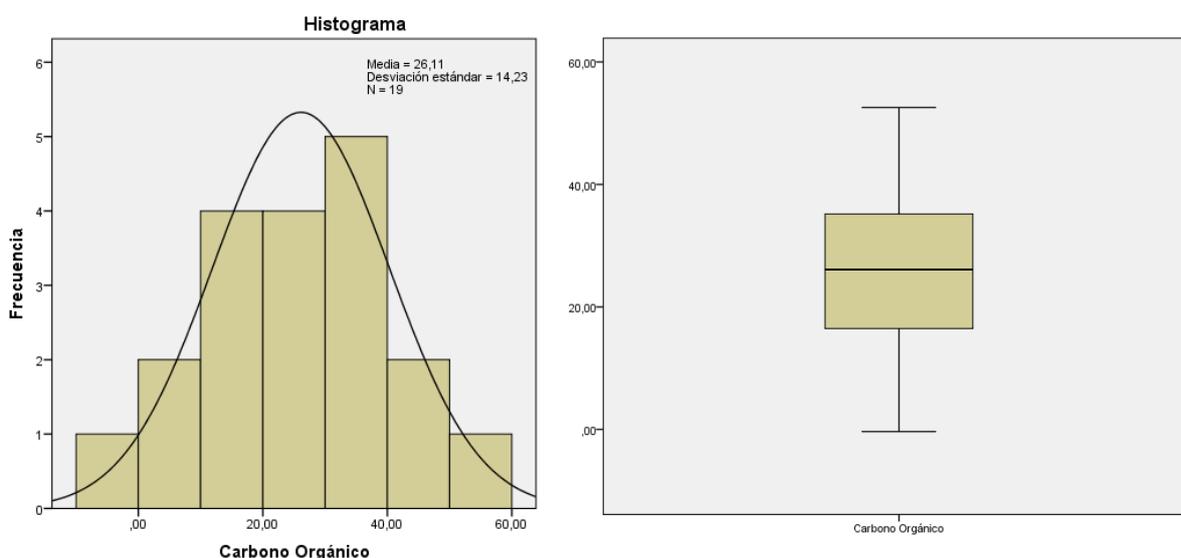
**Tabla 21:** Estadísticos descriptivos de la variable química Carbón orgánico de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Carbón Orgánico	Media	26.1128	3.26453	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	19.2542	
		Límite superior	32.9713	
	Media recortada al 5%	26.1142		
	Mediana	26.1000		
	Varianza	202.486		
	Desviación estándar	14.22976		
	Mínimo	-.35		
	Máximo	52.55		
	Rango	52.90		
	Rango intercuartil	21.69		
	Asimetría	.011	.524	
	Curtosis	-.587	1.014	

**Tabla 22:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Carbón orgánico.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Carbón Orgánico	.990	19	.999

La tabla 22 nos permite observar que la variable Carbón orgánico posee una distribución normal.



**Figura 29:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Carbón orgánico.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 29 que la variable Carbón orgánico no presenta datos atípicos.



• **Nitrógeno total (%)**

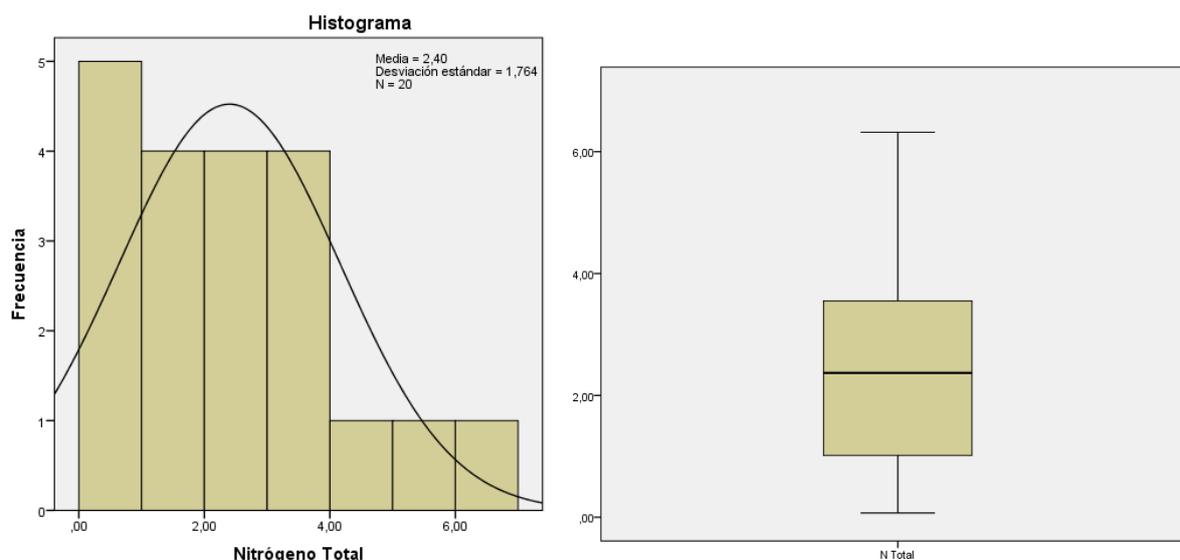
**Tabla 23:** Estadísticos descriptivos de la variable química Nitrógeno total de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Nitrogeno Total	Media	2.4015	.39441	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	1.5760	
		Límite superior	3.2270	
	Media recortada al 5%	2.3133		
	Mediana	2.3700		
	Varianza	3.111		
	Desviación estándar	1.76386		
	Mínimo	.07		
	Máximo	6.32		
	Rango	6.25		
	Rango intercuartil	2.94		
	Asimetría	.377	.512	
	Curtosis	-.091	.992	

**Tabla 24:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Nitrógeno total.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Nitrogeno Total	.933	20	.176

La tabla 24 nos permite observar que la variable Nitrógeno total posee una distribución normal.



**Figura 30:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Nitrógeno total.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 30 que la variable Nitrógeno total no presenta datos atípicos.



• Fosforo (%)

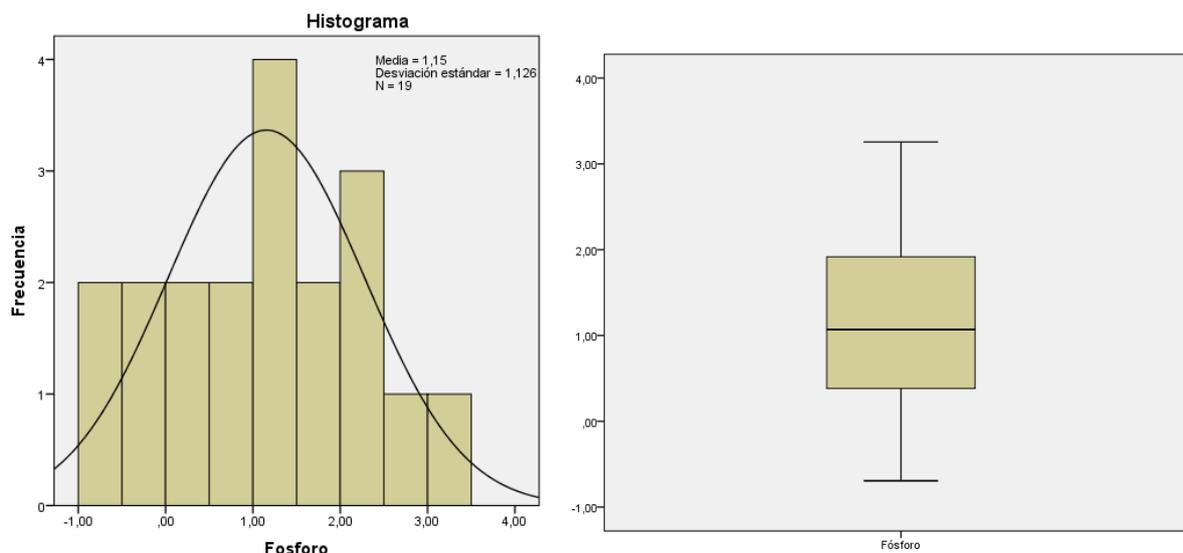
**Tabla 25:** Estadísticos descriptivos de la variable química Fosforo de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Fosforo	Media	1.1539	.25824	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	.6113	
		Límite superior	1.6964	
	Media recortada al 5%	1.1397		
	Mediana	1.0697		
	Varianza	1.267		
	Desviación estándar	1.12566		
	Mínimo	-.69		
	Máximo	3.26		
	Rango	3.95		
	Rango intercuartil	1.73		
	Asimetría	.050	.524	
	Curtosis	-.668	1.014	

**Tabla 26:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Fosforo.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Fosforo	.980	19	.945

La tabla 26 nos permite observar que la variable Fosforo posee una distribución normal.



**Figura 31:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Fosforo.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 31 que la variable Fosforo no presenta datos atípicos.



• **Potasio (%)**

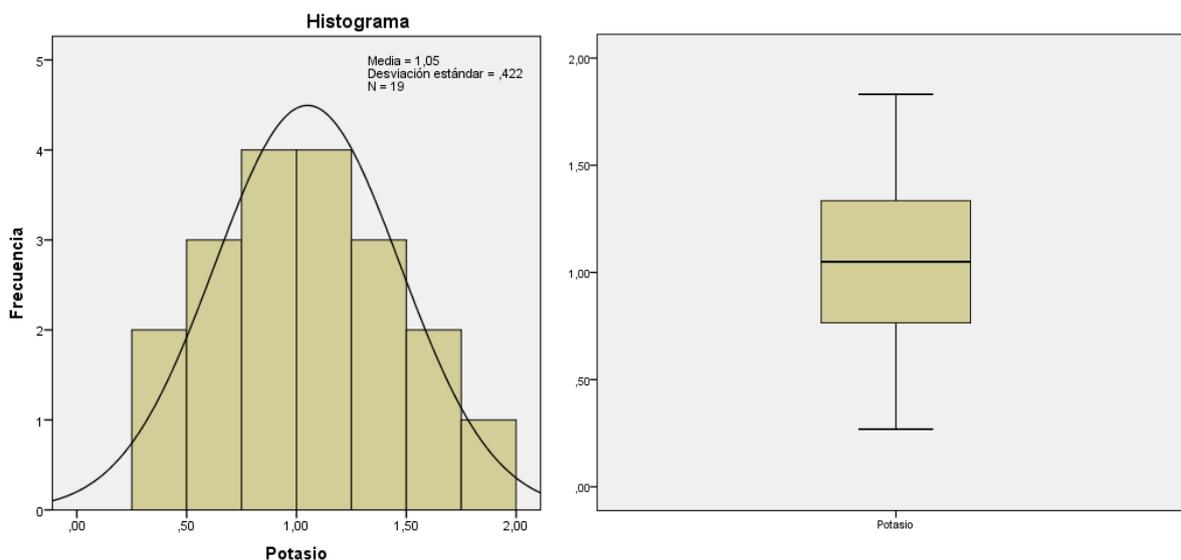
**Tabla 27:** Estadísticos descriptivos de la variable química Potasio de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Potasio	Media	1.0500	.09671	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	.8468	
		Límite superior	1.2532	
	Media recortada al 5%	1.0500		
	Mediana	1.0500		
	Varianza	.178		
	Desviación estándar	.42156		
	Mínimo	.27		
	Máximo	1.83		
	Rango	1.56		
	Rango intercuartil	.64		
	Asimetría	.000	.524	
	Curtosis	-.575	1.014	

**Tabla 28:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Potasio.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Potasio	.993	19	1.000

La tabla 28 nos permite observar que la variable potasio posee una distribución normal.



**Figura 32:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Potasio.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 32 que la variable Potasio no presenta datos atípicos.



• **Calcio (%)**

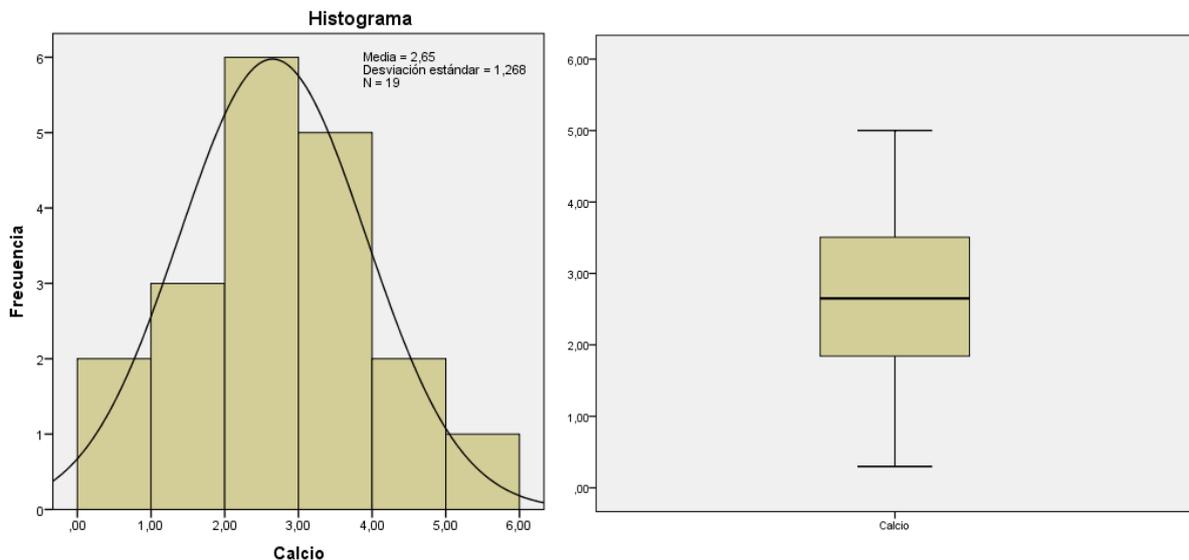
**Tabla 29:** Estadísticos descriptivos de la variable química Calcio de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Calcio	Media	2.6502	.29095	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	2.0390	
		Límite superior	3.2615	
	Media recortada al 5%	2.6502		
	Mediana	2.6500		
	Varianza	1.608		
	Desviación estándar	1.26822		
	Mínimo	.30		
	Máximo	5.00		
	Rango	4.70		
	Rango intercuartil	1.93		
	Asimetría	.001	.524	
	Curtosis	-.569	1.014	

**Tabla 30:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Calcio.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Calcio	.992	19	1.000

La tabla 30 nos permite observar que la variable Calcio posee una distribución normal.



**Figura 33:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Calcio.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 33 que la variable Calcio no presenta datos atípicos.



• **Magnesio (%)**

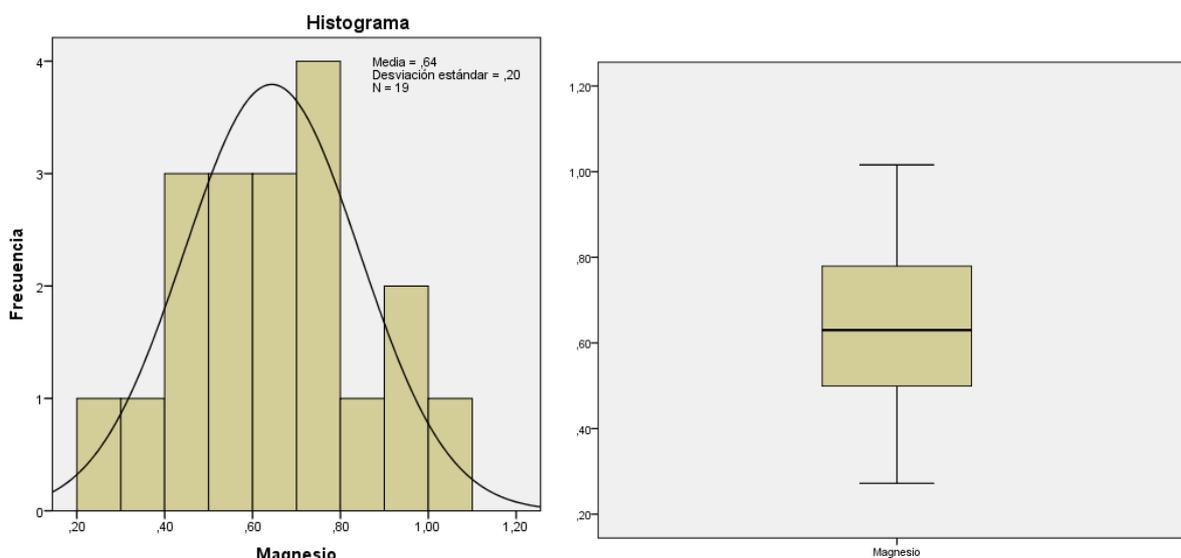
**Tabla 31:** Estadísticos descriptivos de la variable química Magnesio de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Magnesio	Media	.6438	.04584	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	.5475	
		Límite superior	.7401	
	Media recortada al 5%	.6438		
	Mediana	.6298		
	Varianza	.040		
	Desviación estándar	.19980		
	Mínimo	.27		
	Máximo	1.02		
	Rango	.74		
	Rango intercuartil	.32		
	Asimetría	-.010	.524	
	Curtosis	-.581	1.014	

**Tabla 32:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Magnesio.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Magnesio	.989	19	.998

La tabla 32 nos permite observar que la variable Magnesio posee una distribución normal.



**Figura 34:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Magnesio.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 34 que la variable Magnesio no presenta datos atípicos.



• **Azufre (%)**

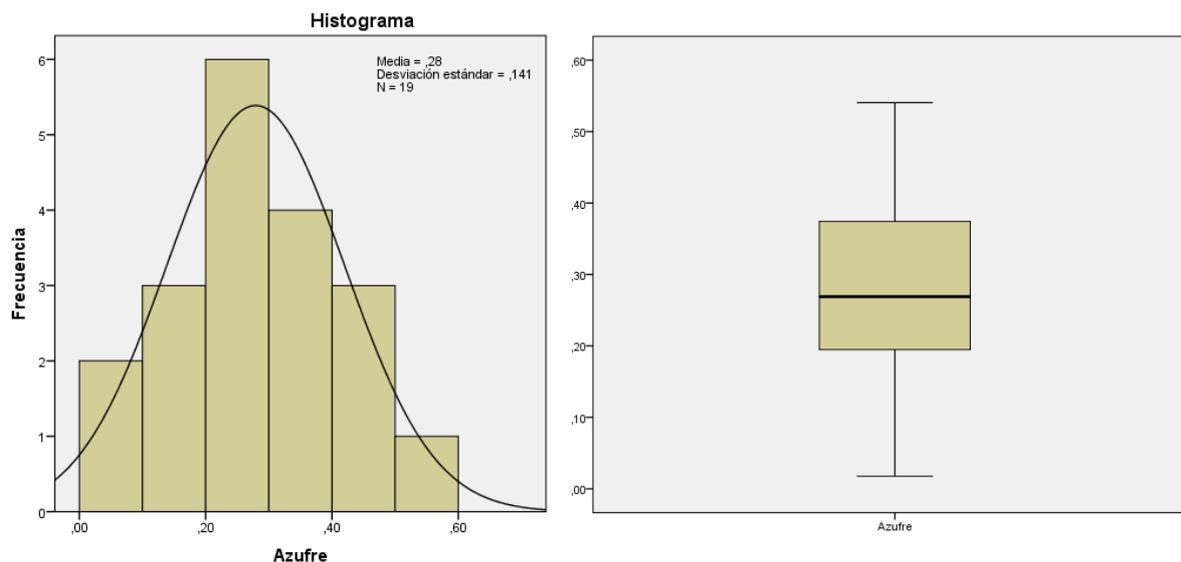
**Tabla 33:** Estadísticos descriptivos de la variable química Azufre de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
Azufre	Media	.2791	.03228	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	.2113	
		Límite superior	.3469	
	Media recortada al 5%	.2792		
	Mediana	.2690		
	Varianza	.020		
	Desviación estándar	.14068		
	Mínimo	.02		
	Máximo	.54		
	Rango	.52		
	Rango intercuartil	.21		
	Asimetría	.008	.524	
	Curtosis	-.560	1.014	

**Tabla 34:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química Azufre.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Azufre	.989	19	.998

La tabla 34 nos permite observar que la variable Azufre posee una distribución normal.



**Figura 35:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química Azufre.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 35 que la variable Azufre no presenta datos atípicos.



• **Relación C/N**

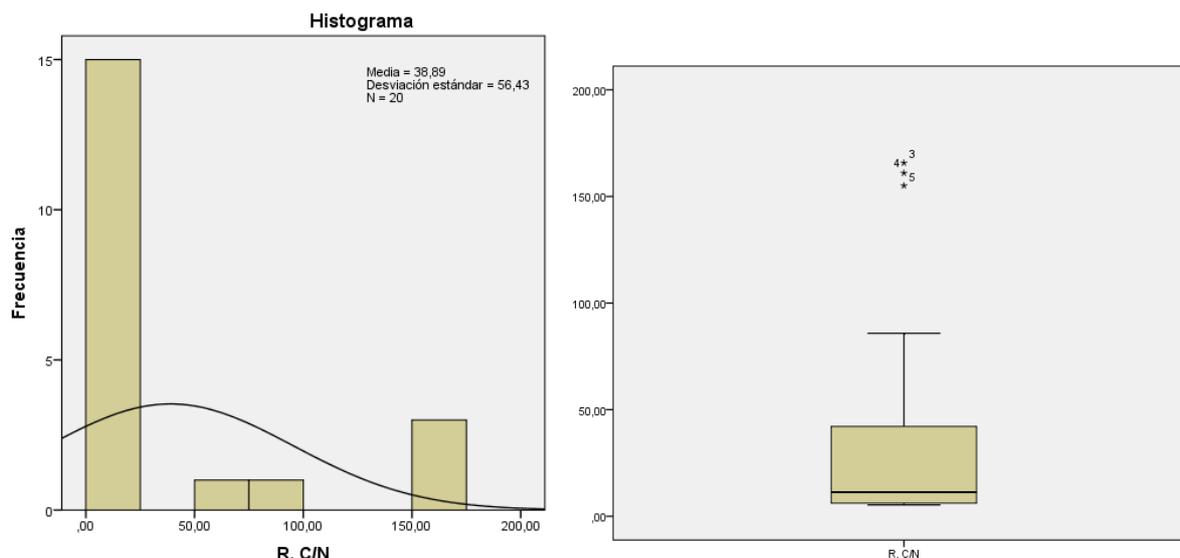
**Tabla 35:** Estadísticos descriptivos de la variable química R. C/N de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
R. C/N	Media	38.8936	12.61816	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	12.4835	
		Límite superior	65.3037	
	Media recortada al 5%	33.7145		
	Mediana	11.2811		
	Varianza	3184.358		
	Desviación estándar	56.43012		
	Mínimo	5.30		
	Máximo	165.71		
	Rango	160.42		
	Rango intercuartil	47.99		
	Asimetría	1.677	.512	
	Curtosis	1.309	.992	

**Tabla 36:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable química R. C/N.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
R. C/N	.621	20	.000

La tabla 36 nos permite observar que la variable R. C/N no posee una distribución normal, lo que nos indica que se deben continuar con análisis no paramétricos.



**Figura 36:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable química R. C/N.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 36 que la variable R. C/N presenta algunos datos atípicos, correspondientes a las observaciones 3, 4 y 5.



• **Diversidad bacteriana (Shannon W.)**

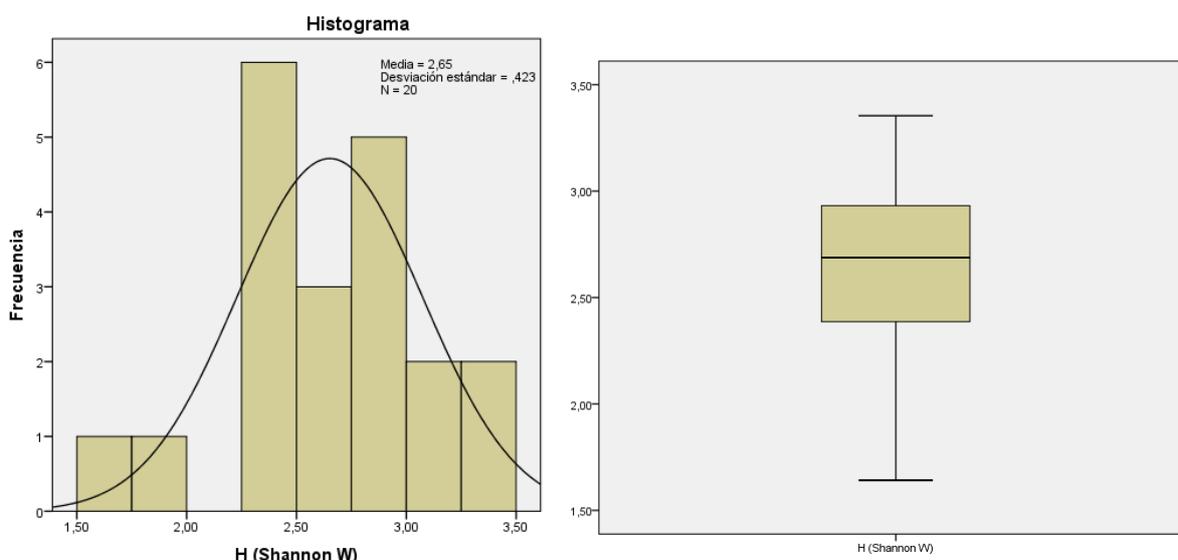
**Tabla 37:** Estadísticos descriptivos de la variable biológica Diversidad bacteriana de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
H (Shannon W)	Media	2.6513	.09461	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	2.4533	
		Límite superior	2.8493	
	Media recortada al 5%	2.6684		
	Mediana	2.6877		
	Varianza	.179		
	Desviación estándar	.42311		
	Mínimo	1.64		
	Máximo	3.35		
	Rango	1.71		
	Rango intercuartil	.56		
	Asimetría	-.539	.512	
	Curtosis	.483	.992	

**Tabla 38:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable biológica Diversidad bacteriana.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
H (Shannon W)	.967	20	.700

La tabla 38 nos permite observar que la variable diversidad posee una distribución normal.



**Figura 37:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable biológica Diversidad bacteriana.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 37 que la variable Diversidad bacteriana no presenta datos atípicos.



• Riqueza

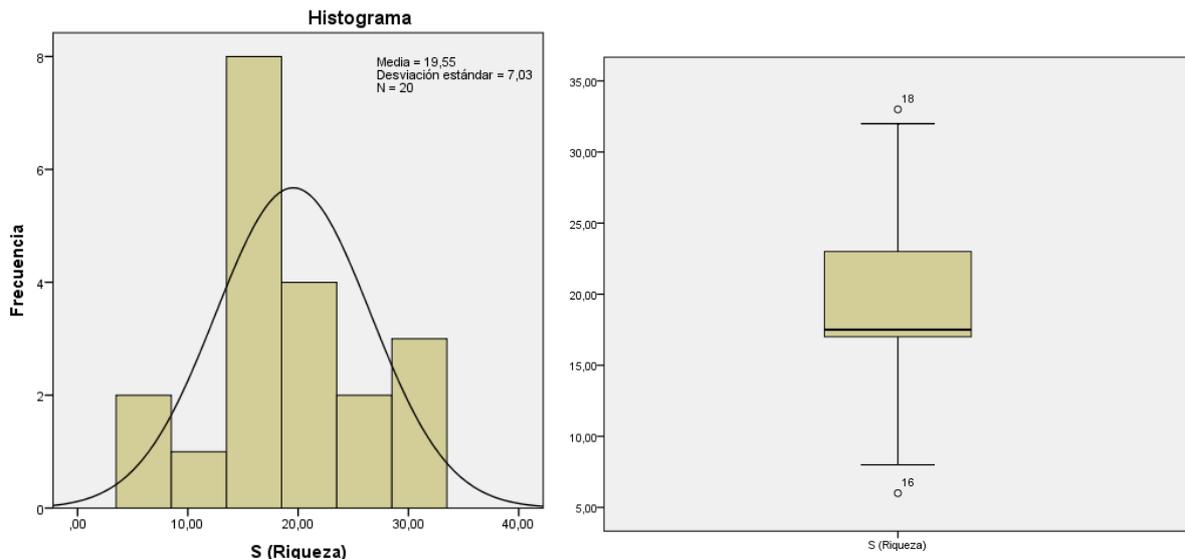
**Tabla 39:** Estadísticos descriptivos de la variable biológica Riqueza bacteriana de las muestras de compost de las plantas Emac y La Italiana.

		Estadístico	Error estándar	
S (Riqueza)	Media	19.5500	1.57192	
	95% de intervalo de confianza para la	Límite inferior	16.2599	
		Límite superior	22.8401	
	Media recortada al 5%	19.5556		
	Mediana	17.5000		
	Varianza	49.418		
	Desviación estándar	7.02982		
	Mínimo	6.00		
	Máximo	33.00		
	Rango	27.00		
	Rango intercuartil	6.50		
	Asimetría	.159	.512	
	Curtosis	.081	.992	

**Tabla 40:** Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la variable biológica Riqueza bacteriana.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
S (Riqueza)	.956	20	.472

La tabla 40 nos permite observar que la variable riqueza posee una distribución normal.



**Figura 38:** Histograma, curva de distribución normal y diagrama de cajas para la variable biológica Riqueza bacteriana.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la de la figura 38 que la variable Riqueza bacteriana presenta algunos datos atípicos, correspondientes a las observaciones 18 y 16.



**Tabla 41:** Resultados del análisis estadístico de las características físico-químicas de las muestras de compost; test de Levene y prueba de *t* para muestras independientes, de las plantas estudiadas (**A** y **B**)

		Prueba de muestras independientes				
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba <i>t</i> para la igualdad de medias		
		F	Sig.	<i>t</i>	gl	Sig. (bilateral)
<b>Temperatura Interna</b>	Se asumen varianzas iguales	.780	.389	1.237	18	.232
<b>pH</b>	Se asumen varianzas iguales	.772	.391	5.279	18	.000
<b>Ce</b>	Se asumen varianzas iguales	3.340	.084	-4.589	18	.000
<b>Humedad</b>	Se asumen varianzas iguales	.114	.740	-4.703	17	.000
<b>N Total</b>	Se asumen varianzas iguales	.103	.752	-5.427	18	.000
<b>Materia Orgánica</b>	Se asumen varianzas iguales	.333	.572	-5.928	17	.000
<b>Carbón Org.</b>	Se asumen varianzas iguales	.333	.572	-5.928	17	.000

**Tabla 42:** Resultados del análisis estadístico de la variable química R. C/N de las muestras de compost; test no paramétrico de U Mann-Withney ( $p < 0,05$ ), de las plantas estudiadas (**A** y **B**).

Estadísticos de prueba <sup>a</sup>	
	R. C/N
U de Mann-Whitney	48.000
Sig. asintótica (bilateral)	.909
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	.941 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: Sustrato

b. No corregido para empates.

La tabla 42 nos indica que no existen diferencias significativas para la variable R. C/N con respecto a cada una de las plantas de Compostaje estudiadas.



**Anexo 6:** Test de correlación paramétrico *R* de Pearson para las variables físicas y químicas que presentan una distribución normal de sus datos con las variables Diversidad y riqueza bacteriana.

Variables		Planta A		Planta B	
		H	S *	H	S*
Temperatura Interna	Correlación de Pearson	.477	.140	-.180	-.029
	Sig. (bilateral)	.138	.681	.643	.942
Humedad	Correlación de Pearson	-.186	-.465	.203	.282
	Sig. (bilateral)	.583	.150	.629	.499
pH	Correlación de Pearson	.506	.426	.695*	.667*
	Sig. (bilateral)	.112	.192	.038	.050
Ce	Correlación de Pearson	.180	.547	-.290	-.328
	Sig. (bilateral)	.597	.082	.450	.389
N Total	Correlación de Pearson	-.018	-.048	-.182	-.354
	Sig. (bilateral)	.958	.889	.639	.350
Materia Orgánica	Correlación de Pearson	-.109	-.038	-.209	-.223
	Sig. (bilateral)	.750	.912	.620	.595
Carbono Orgánico	Correlación de Pearson	-.109	-.038	-.209	-.223
	Sig. (bilateral)	.750	.912	.620	.595
P	Correlación de Pearson	-.034	-.010	.049	.081
	Sig. (bilateral)	.922	.977	.908	.849
K	Correlación de Pearson	-.337	.018	.075	.042
	Sig. (bilateral)	.342	.960	.847	.915
Ca	Correlación de Pearson	-.434	-.380	.002	.130
	Sig. (bilateral)	.182	.249	.997	.759
Mg	Correlación de Pearson	-.097	.113	-.157	-.145
	Sig. (bilateral)	.776	.741	.711	.732
S	Correlación de Pearson	-.118	-.169	.228	.359
	Sig. (bilateral)	.729	.620	.587	.382

\*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Negativa	Fuerte	Positiva	Fuerte		
	Moderada		Moderada		

Diversidad bacteriana (H), riqueza bacteriana (S\*)



**Tabla 42:** Test de correlación paramétrico *R de Pearson* para las variables físicas y químicas

	Temperatura Interna	Humedad	pH	Ce	N Total	Materia Orgánica	Carbono Orgánico	P	K	Ca	Mg	S	
Temperatura Interna	1	.164	.358	-.276	-.243	-.064	-.064	-.346	-.153	-.280	-.366	-.235	
Humedad	.164	1	-.563*	.352	.661**	.794**	.794**	.518*	-.841**	.339	-.445	.416	
pH	.358	-.563*	1	-.649**	-.654**	-.617**	-.617**	-.698**	.574*	-.547*	.065	-.443	
Ce	-.276	.352	-.649**	1	.629**	.765**	.765**	.505*	-.598**	.203	-.081	.148	
N Total	-.243	.661**	-.654**	.629**	1	.670**	.670**	.638**	-.625**	.341	-.177	.375	
Materia Orgánica	-.064	.794**	-.617**	.765**	.670**	1	1,000**	.523*	-.739**	.359	-.061	.321	
Carbono Orgánico	-.064	.794**	-.617**	.765**	.670**	1,000**	1	.523*	-.739**	.359	-.061	.321	
P	-.346	.518*	-.698**	.505*	.638**	.523*	.523*	1	-.542*	.833**	.259	.817**	
K	-.153	-.841**	.574*	-.598**	-.625**	-.739**	-.739**	-.542*	1	-.220	.369	-.262	
Ca	-.280	.339	-.547*	.203	.341	.359	.359	.833**	-.220	1	.448	.938**	
Mg	-.366	-.445	.065	-.081	-.177	-.061	-.061	.259	.369	.448	1	.355	
S	-.235	.416	-.443	.148	.375	.321	.321	.817**	-.262	.938**	.355	1	
**.				Negativa		Muy Fuerte		Positiva		Muy fuerte			
*.						Fuerte				Fuerte			

Conductividad eléctrica (**Ce**)

**Anexo 7:** Test de correlación no paramétrico *Rho de Spearman* para la variable R. C/N con las variables Diversidad y riqueza bacteriana.

Planta de Compostaje			H	S*	
Rho de Spearman	Planta A	R. C/N	Coefficiente correlación	-.291	-.339
			Sig. (bilateral)	.385	.307
	Planta B	R. C/N	Coefficiente correlación	.167	.317
			Sig. (bilateral)	.668	.406

\*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Diversidad bacteriana (**H**), riqueza bacteriana (**S\***)



**Anexo 8:** Características físico-químicas y biológicas de cada una de las muestras de compost de las dos plantas bajo estudio (**A** y **B**).

	Código Muestra	Edad de Compostaje (días)	Temperatura Int. C	pH	Ce (dSm-1)	Humedad (%)	Materia Organica (%)	R. C/N
Planta de compost Emac ( <b>A</b> )	1070	5	80	7.82	1.75	52.1	19.71	5.86
	1067	12	54.5	7.94	1.74	56	26.71	6.30
	1068	19	60	7.9	1.6	49.6	18.71	155.06
	1069	26	63	8.07	2.16	51	23.00	7.37
	1071	33	63	8.3	2.5	50.3	22.00	5.60
	1072	40	61	8.5	2.5	47.4	25.00	65.91
	1073	46	63	8.7	2.5	46.8	20.71	85.82
	1074	57	61	8.65	2.65	42.9	19.29	5.95
	1075	96	44	7.77	2.46	29.97	19.29	5.62
	1076	103	50	8.1	3.27	25.8	20.00	165.71
1077	117	40	7.2	3.17	29.6	19.43	160.98	
Planta de compost La ITALIANA ( <b>B</b> )	1080	7	57.6	7.07	2.36	64.7	86.57	14.90
	1078	14	54.5	6.86	4.4	66.24	83.00	13.48
	1079	21	62.8	7.05	4.6	61.9	80.43	18.37
	1081	32	57.5	7.2	4.74	55.5	74.57	11.88
	1082	41	55.9	6.75	4.3	53.6	73.86	10.60
	1083	55	54.3	7.18	5.17	59.7	80.29	8.72
	1084	68	49.1	7.57	3.8	56.4	65.00	10.68
	1085	83	46.5	7.75	2.6	52.8	65.00	13.76
	1086	110	37.5	7.01	3.62	52.4	57.71	5.30

	Código Muestra	Edad de Compostaje (días)	Porcentaje %						
			Carbono O.	N Total	P	K	Ca	Mg	S
Planta de compost Emac ( <b>A</b> )	1070	5	11.43	1.95	0.26	1.39	2.16	0.62	0.18
	1067	12	15.49	2.46	0.25	1.43	2.20	0.57	0.20
	1068	19	10.85	0.07	0.23	1.22	2.03	0.63	0.17
	1069	26	13.34	1.81	0.18	1.44	1.66	0.69	0.15
	1071	33	12.76	2.28	0.22	1.32	2.02	0.61	0.16
	1072	40	14.50	0.22	0.20	1.40	1.76	0.58	0.17
	1073	46	12.01	0.14	0.18	1.31	1.51	0.69	0.14
	1074	57	11.19	1.88	0.26	1.59	2.03	0.63	0.18
	1075	96	11.19	1.99	0.25	1.57	2.05	0.71	0.22
	1076	103	11.60	0.07	0.20	1.54	2.05	0.74	0.15
1077	117	11.27	0.07	0.43	1.50	2.09	0.66	0.17	
Planta de compost La ITALIANA ( <b>B</b> )	1080	7	50.21	2.54	1.20	0.17	2.56	0.17	0.41
	1078	14	48.14	3.37	2.25	0.77	2.72	0.83	0.31
	1079	21	46.65	3.57	1.71	0.46	2.47	0.50	0.33
	1081	32	43.25	3.64	1.89	0.55	3.41	0.57	0.44
	1082	41	42.84	4.04	2.57	0.67	4.02	0.76	0.43
	1083	55	46.57	5.34	0.33	0.11	0.39	0.07	0.11
	1084	68	37.70	3.53	2.78	0.82	3.98	0.83	0.47
	1085	83	37.70	2.74	3.36	0.83	5.34	0.93	0.52
	1086	110	33.47	6.32	4.30	0.93	6.74	1.09	0.68



**Anexo 9** : Aislados de microorganismos termófilos incubados en medio LB y AN a 55° C durante 24 h, para cada una de las muestras de compost de las plantas estudiadas A y B. La muestra marcada se considera perdida ya que no se pudo obtener colonias a partir del criobanco por razones desconocidas.

Identificación de los Aislados a 55° C					
Planta EMAC (A)			Planta La Italiana (B)		
ID	Código	Muestra/ Medio de aislamiento	ID	Código	Muestra/ Medio de aislamiento
<u>Term 1</u>	<u>CO 1.1</u>	<u>1067 / AN</u>	<b>Term 23</b>	78.1	1078 / LB
<b>Term 2</b>	CO 2.1	1068 / AN	<b>Term 24</b>	78.2	1078 / LB
<b>Term 3</b>	CO 1.2	1067 / AN	<b>Term 25</b>	79.1	1079 / LB
<b>Term 4</b>	CO 2.2	1068 / AN	<b>Term 26</b>	79.2	1079 / LB
<b>Term 5</b>	CO 3.1	1069 / AN	<b>Term 27</b>	80.1	1080 / LB
<b>Term 6</b>	CO 3.2	1069 / AN	<b>Term 28</b>	80.2	1080 / LB
<b>Term 7</b>	CO 4.1	1070 / AN	<b>Term 29</b>	81.1	1081 / LB
<b>Term 8</b>	CO 5.2	1071 / AN	<b>Term 30</b>	81.2	1081 / LB
<b>Term 9</b>	CO 6.1	1072 / AN	<b>Term 31</b>	82.1	1082 / LB
<b>Term 10</b>	CO 6.2	1072 / AN	<b>Term 32</b>	82.2	1082 / LB
<b>Term 11</b>	CO 7.1	1073 / AN	<b>Term 33</b>	82.2.2	1082 / LB
<b>Term 12</b>	CO 7.2	1073 / AN	<b>Term 34</b>	83.1	1083 / LB
<b>Term 13</b>	CO 2.1	1068 / LB	<b>Term 35</b>	83.2	1083 / LB
<b>Term 14</b>	CO 3.2	1069 / LB	<b>Term 36</b>	84.2	1084 / LB
<b>Term 15</b>	CO 4.1	1070 / LB	<b>Term 37</b>	85.1	1085 / LB
<b>Term 16</b>	CO 4.2	1070 / LB	<b>Term 38</b>	85.2	1085 / LB
<b>Term 17</b>	CO 5.2	1071 / LB	<b>Term 39</b>	86.1	1086 / LB
<b>Term 18</b>	CO 6.1.1	1072 / LB	<b>Term 40</b>	86.2	1086 / LB
<b>Term 19</b>	CO 6.1.2	1072 / LB	<b>Term 41</b>	78.2	1078 / AN
<b>Term 20</b>	CO 6.2	1072 / LB	<b>Term 42</b>	81.1	1081 / AN
<b>Term 21</b>	CO 7.1	1073 / LB	<b>Term 43</b>	82.2	1082 / AN
<b>Term 22</b>	CO 7.2	1073 / LB	<b>Term 44</b>	83.1	1083 / AN
			<b>Term 45</b>	84.1	1084 / AN
			<b>Term 46</b>	84.2	1084 / AN